

Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller



Identifikation neuer Bindungspartner
des c-MYC/MIZ-1–Netzwerks und
Charakterisierung der Regulation der Transkription
durch die c-MYC–Kofaktoren H2A.Z und MED24

Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von Till Adhikary
aus Hamburg

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 10.12.2008 angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Alfred Batschauer

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Eilers

Tag der mündlichen Prüfung: 23.1.2009

Für Sovana

Zusammenfassung

Das Proto-Onkogen *c-MYC* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von Zielgenen entweder aktiviert oder reprimiert. Die Repression wird bei Zielgenen wie *P15INK4B* und *P21CIP1* durch Bindung an den ansonsten aktivierend wirkenden Transkriptionsfaktor MIZ-1 vermittelt, wodurch dessen aktivierende Wirkung gehemmt wird. Nach chromatographischer Anreicherung von MIZ-1 konnten durch massenspektrometrische Analyse die putativen Bindungspartner Mi2- β /CHD4 (Chromodomäne–Helikase–DNA-bindendes Protein 4) und Insulinrezeptorsubstrat 4 (IRS4) identifiziert und durch Koimmunpräzipitationen Interaktionen von diesen mit *c-MYC* gezeigt werden. Neben Mi2- β /CHD4 wurden auch andere Komponenten des NuRD (*nucleosome remodeling and histone deacetylation*)-Komplexes, der als Repressor der Transkription beschrieben wurde, in den analysierten Fraktionen nachgewiesen. Dies deutet auf einen möglichen Mechanismus der Repression durch *c-MYC* und MIZ-1 hin. Für ein anderes Mitglied der Insulinrezeptorsubstratfamilie, IRS1, wurde eine Funktion als Transkriptionsfaktor gezeigt, was eine transkriptionsregulierende Wechselwirkung von IRS4 mit dem *c-MYC*/MIZ-1-Netzwerk vermuten läßt.

H2A.Z ist eine hochkonservierte Variante des kanonischen Histons H2A, welche bei Säugetieren essentiell ist und eine Rolle bei der Regulation der Transkription spielt. In *Drosophila melanogaster* wird die zu H2A.Z orthologe Histonvariante H2Av durch die ATPase Domino des Tip60 (Tat-interagierendes Protein, 60 kDa)-Komplexes ausgetauscht; *c-MYC* kann in Säugetierzellen den Tip60-Komplex rekrutieren. Hier konnte in *c-MYC*-induzierbaren 3T3-immortalisierten Mausfibroblasten gezeigt werden, daß während der Genaktivierung durch *c-MYC* an den Promotoren von Zielgenen H2A.Z zunächst nahe der Transkriptionsstartstelle rekrutiert und daraufhin wieder entfernt wird. Dieser Vorgang korrelierte mit einem deutlichen Anstieg der Expression des *c-MYC*-Zielgens *ccnd2* (Zyklin D2). Eine shRNA-vermittelte Herunterregulation der Expression von H2A.Z in *c-MYC*-induzierbaren humanen Osteosarkomzellen bewirkte sowohl eine verminderte Aktivierung als auch eine verminderte Repression von *c-MYC*-Zielgenen.

Der hochkonservierte Mediator-Komplex spielt die Rolle eines Vermittlers zwischen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II. c-MYC interagiert in menschlichen Zelllinien direkt mit der Mediator-Untereinheit MED24/TRAP100. Durch shRNA-vermittelte Herunterregulation der Expression von *med24* und *cdk8* (welches für eine weitere, fakultative Mediator-Untereinheit kodiert) in c-MYC-induzierbaren immortalisierten Mausfibroblasten wurde hier gezeigt, daß die Interaktion von c-MYC mit Med24 sowie das Vorhandensein von Cdk8 für die Aktivierung und auch die Repression nahezu aller c-MYC-Zielgene notwendig ist. Außerdem bewirkte die verminderte Expression von *med24* und *cdk8* das Ansteigen des Expressionsniveaus einiger, jedoch nicht aller untersuchten aktivierten c-MYC-Zielgene. Desweiteren konnte in c-MYC-induzierbaren humanen Osteosarkomzellen am *CCND2*-Promotor eine c-MYC-abhängige Rekrutierung der Mediator-Untereinheiten MED1 und CDK8 gezeigt werden, was auf eine Beteiligung des Mediator-Komplexes inklusive seines fakultativen CDK8-Moduls an der Aktivierung des Promotors hindeutet.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	XIII
Abbildungsverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Chromatinstruktur	1
1.1.1 Das Nukleosom	1
1.1.2 Chromatinfasern	2
1.1.3 Histonvarianten	3
1.1.3.1 H2A.Z	3
1.1.4 Histonaustausch	5
1.1.4.1 Austausch und Lokalisation von H2A.Z	5
1.1.5 Histonmodifikationen	8
1.1.6 Histonacetyltransferasen	9
1.1.6.1 Der NuA4/Tip60-Komplex	10
1.2 Transkription	11
1.2.1 Die RNA-Polymerasen	11
1.2.2 Die RNA-Polymerase II	11
1.2.3 Der Präinitiationskomplex	12
1.2.4 Transkriptionsfaktoren	13
1.2.5 Der Mediator-Komplex	13
1.2.5.1 Die Struktur des Mediator-Komplexes	13
1.2.5.2 Die Funktion des Mediator-Komplexes	15
1.3 c-MYC	16
1.3.1 DNA-Bindung durch c-MYC	17
1.3.2 Regulation der Transkription durch c-MYC und MAX	18
1.3.3 Funktionen von c-MYC	19
1.3.4 MycER	20
1.3.5 Die Interaktion von c-MYC mit dem Mediator-Komplex	20
1.4 MIZ-1	21
1.4.1 Die Interaktion von c-MYC und MIZ-1	22

1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	22
1.5.1	Identifizierung MIZ-1–assoziierter Proteine	22
1.5.2	Histonaustausch von H2A.Z durch c-MYC	23
1.5.3	Charakterisierung der Interaktion von c-MYC mit dem Mediator-Komplex <i>via</i> MED24	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Geräte und sonstige Materialien	24
2.1.1.1	Begasungsbrutschränke	24
2.1.1.2	Durchflußzytometer	24
2.1.1.3	Elektroblot-Apparaturen	24
2.1.1.4	Elektrophorese-Apparaturen	24
2.1.1.5	HPLC-Anlage	25
2.1.1.6	Mikroskope	25
2.1.1.7	Netzteile für Elektrophorese und Elektroimmunoblot	25
2.1.1.8	Objektträger und Deckgläser	25
2.1.1.9	Photometer	25
2.1.1.10	Plastikröhrchen, Plastikplatten	25
2.1.1.11	PVDF-Membran	26
2.1.1.12	Röntgenfilme	26
2.1.1.13	Schüttelinkubator	26
2.1.1.14	Thermozykler und Heizblöcke	26
2.1.1.15	Ultraschall-Desintegrator	26
2.1.1.16	Ultraviolett-Tisch	26
2.1.1.17	Vakuumkonzentrator	27
2.1.1.18	Whatman-Filterpapier	27
2.1.1.19	Zentrifugen	27
2.1.2	Chemikalien	27
2.1.3	Puffer und andere Lösungen	27
2.1.3.1	Anodenpuffer I	28
2.1.3.2	Anodenpuffer II	28
2.1.3.3	Bradford-Lösung	28
2.1.3.4	ChIP-Lysepuffer I	28
2.1.3.5	ChIP-Lysepuffer II (RIPA-Puffer)	28
2.1.3.6	ChIP-Waschpuffer I	28
2.1.3.7	ChIP-Waschpuffer II	29
2.1.3.8	ChIP-Waschpuffer III	29
2.1.3.9	ChIP-Elutionspuffer	29

2.1.3.10	Chromatographie-Puffer (C-Puffer)	29
2.1.3.11	Dignam-Puffer A	29
2.1.3.12	Dignam-Puffer B	29
2.1.3.13	Dignam-Puffer D	30
2.1.3.14	DNA-Ladepuffer (2×)	30
2.1.3.15	DNA-Ladepuffer (6×)	30
2.1.3.16	DSG	30
2.1.3.17	Ethidiumbromid	30
2.1.3.18	Geextraktionspuffer	30
2.1.3.19	Glykogen	30
2.1.3.20	HBS (2×)	31
2.1.3.21	Kathodenpuffer	31
2.1.3.22	Laemmli-Ladepuffer (6×)	31
2.1.3.23	MMLV-RT-Puffer (5×)	31
2.1.3.24	NP40-Lysepuffer	31
2.1.3.25	PAGE-Laufpuffer	31
2.1.3.26	PBS (10×)	31
2.1.3.27	Polybren	32
2.1.3.28	Proteaseinhibitorgemisch	32
2.1.3.29	RNase-Inhibitor	32
2.1.3.30	Tankblot-Puffer	32
2.1.3.31	TBS (10×)	32
2.1.3.32	TBS-T	32
2.1.3.33	TE	32
2.1.3.34	TNN-Lysepuffer	33
2.1.3.35	TRIzol/TRIfast zur RNA-Isolation	33
2.1.4	Enzyme und Kits	33
2.1.4.1	Reverse Transkriptase	33
2.1.4.2	Restriktionsendonukleasen	33
2.1.4.3	Proteinase K	33
2.1.4.4	RNase A	33
2.1.4.5	T4 DNA-Ligase	34
2.1.4.6	Kits für DNA-Reinigung	34
2.1.4.7	Kits für quantitative PCR	34
2.1.4.8	Kit für Silberfärbung	34
2.1.5	Antikörper	34
2.1.5.1	Primärantikörper	34
2.1.5.2	Sekundärantikörper	35
2.1.6	Sonstige Proteine und Reagenzien	35

2.1.6.1	BMC-H1	35
2.1.6.2	BSA	36
2.1.6.3	DMEM	36
2.1.6.4	FCS	36
2.1.6.5	Medien für die Chromatographie	36
2.1.6.6	Molekulargewichtsmarker	36
2.1.6.7	NCS	37
2.1.6.8	Protein A-Sepharose	37
2.1.6.9	Protein G-Sepharose	37
2.1.7	Oligonukleotide und Plasmide	37
2.1.7.1	Hexamer-Primer für die cDNA-Synthese	37
2.1.7.2	Oligonukleotide für qRT-PCR	37
2.1.7.3	Oligonukleotide für ChIP-PCR	38
2.1.7.4	Oligonukleotide für ChIP-qPCR	39
2.1.7.5	Oligonukleotide für Klonierungen	40
2.1.8	Vektoren	40
2.1.8.1	pCDNA3	40
2.1.8.2	pCDNA3–MIZ-1	41
2.1.8.3	pCDNA3–c-MYC	41
2.1.8.4	Mi2 β –FLAG	41
2.1.8.5	pSUPER.retro.puro	41
2.1.8.6	pSUPER.retro.blasti	41
2.1.9	Zelllinien und Bakterienstämme	41
2.1.9.1	<i>E.coli</i> DH5 α	41
2.1.9.2	HEK293T	42
2.1.9.3	ϕ NX-Eco	42
2.1.9.4	NIH3T3	42
2.1.9.5	NIH3T3 MycER hygro K1	42
2.1.9.6	p27 ^{-/-} 3T3 MycER puro K3	42
2.1.9.7	3T3 MycER puro	42
2.1.9.8	Rat1 MycER puro	42
2.1.9.9	TGR-1	43
2.1.9.10	HO15.19B	43
2.1.9.11	HO-MYC3	43
2.1.9.12	U2OS	43
2.1.9.13	U2OS MycER hygro K9	43
2.2	Methoden	43
2.2.1	Bioinformatische Methoden	43
2.2.1.1	Erstellung von Primer-Sequenzen	43

2.2.1.2	Sequenzanalyse und -vergleich	44
2.2.2	Zellkultur	44
2.2.2.1	Auftauen von Zellen	44
2.2.2.2	Einfrieren von Zellen	45
2.2.2.3	Kultivierung von Zellen	45
2.2.2.4	Trypsinieren und Aussäen von Zellen	46
2.2.2.5	Herstellung von Hybridoma-Überständen	46
2.2.2.6	Transfektion eukaryotischer Zellen	46
2.2.2.7	Retrovirale Infektion eukaryotischer Zellen	47
2.2.2.8	Aktivierung des MycER-Fusionsproteins durch 4-OHT	47
2.2.3	Biochemische Methoden	48
2.2.3.1	Reinigung polyklonaler Antikörper aus Serum	48
2.2.3.2	Herstellung von Zellysaten	48
2.2.3.3	Herstellung von Kernextrakten	49
2.2.3.4	Saure Extraktion basischer Proteine	49
2.2.3.5	Herstellung von S100-Extrakten	49
2.2.3.6	Bradford-Assay	50
2.2.3.7	Immunpräzipitation	50
2.2.3.8	SDS-PAGE	50
2.2.3.9	Elektroimmunoblot	51
2.2.3.10	Chemolumineszenz	51
2.2.3.11	Kolonie-Assay	51
2.2.4	Chromatographie	52
2.2.4.1	Phosphozellulose-Flüssigchromatographie	52
2.2.4.2	Gelfiltration	52
2.2.4.3	Ionentauscher-Flüssigchromatographie	53
2.2.5	Molekularbiologische Methoden	53
2.2.5.1	Plasmidpräparation	53
2.2.5.2	RNA-Isolation	54
2.2.5.3	cDNA-Synthese	54
2.2.5.4	Klonierung	55
2.2.5.5	Agarosegelelektrophorese	55
2.2.5.6	Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	55
2.2.5.7	DNA-Extraktion nach der <i>crush and soak</i> -Methode	56
2.2.5.8	Standard-PCR	56
2.2.5.9	Quantitative PCR	56
2.2.5.10	Chromatinimmunpräzipitation	57
2.2.5.11	Durchflußzytometrie	60

3	Ergebnisse	61
3.1	Identifikation MIZ-1–assoziierter Proteine	61
3.1.1	Reinigung des MIZ-1–Komplexes mittels Chromatographie . . .	61
3.1.2	Überprüfung der Interaktionen mittels Koimmunpräzipitation . .	64
3.1.2.1	Exogenes c-MYC interagiert mit exogenem Mi2 β /CHD4	64
3.1.2.2	Endogenes c-MYC interagiert mit endogenem IRS4 .	64
3.2	c-MYC–vermittelter Austausch von H2A.Z	66
3.2.1	Promotor-Bindungsstudien	66
3.2.2	Expressionsanalysen	71
3.2.2.1	Genomweite Auswirkung gehemmter H2A.Z-Expressi- on auf MYC-Zielgene	74
3.2.2.2	Auswirkung gehemmter H2A.Z-Expression auf die Ex- pression einzelner MYC-Zielgene in humanen Osteo- sarkomzellen	74
3.2.2.3	Auswirkung gehemmter h2a.z-, p400- oder srcap-Ex- pression auf die Expression von ccnd2 in Mausfibro- blasten	75
3.2.3	Biologische Relevanz	76
3.2.3.1	RNAi gegen h2a.z in Mausfibroblasten	76
3.2.3.2	RNAi gegen h2a.z in MLL-ENL–immortalisierten mye- loiden Progenitoren	78
3.3	Charakterisierung der Interaktion von c-MYC mit MED24	79
3.3.1	Expressionsanalysen	79
3.3.2	Keine Veränderung der S-Phase–Induktion durch MycER nach Depletion von Med24 in NIH3T3-Zellen	81
3.3.3	MYC rekrutiert den Mediator-Komplex mit CDK8-Modul an Pro- motoren von Zielgenen	82
4	Diskussion	84
4.1	Identifikation MIZ-1–assoziierter Proteine	84
4.1.1	Mi2 β /CHD4	85
4.1.2	IRS4	85
4.2	c-MYC–vermittelter Austausch von H2A.Z	87
4.3	Charakterisierung der Interaktion von c-MYC mit MED24	91
A	Literaturverzeichnis	95
B	Abkürzungsverzeichnis	103
B.1	Präfixe	103
B.2	Einheiten	103

B.3	Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren	104
B.4	Organismen, Proteine, Proteindomänen und andere Biomoleküle . . .	104
B.5	Lösungen und Chemikalien	109
B.6	Andere Abkürzungen	110
C	Ergebnislisten massenspektrometrischer Analysen	112
D	Ergebnislisten von cDNA-Microarray-Expressionsanalysen	116
E	Plasmidkarten	127
E.1	pCDNA3	127
E.2	pSUPER.retro	128
F	Veröffentlichungen	129
G	Danksagungen	130
H	Lebenslauf	131
I	Ehrenwörtliche Erklärung	132

Tabellenverzeichnis

1.1	Histonvarianten und ihre Funktionen	4
1.2	H2A.Z-bindende und verwandte Komplexe	7
2.1	Primärantikörper	35
2.2	qRT-PCR-Primer (Mensch)	38
2.3	qRT-PCR-Primer (Maus)	38
2.4	ChIP-PCR-Primer (Maus)	38
2.5	ChIP-qPCR-Primer (Mensch)	39
2.6	ChIP-qPCR-Primer (Maus)	39
2.7	ChIP-qPCR-Primer (Ratte)	40
2.8	shRNA-Sequenzen	40
2.9	Kultur- und Hungermedien verschiedener Zelllinien und Klone	45
3.1	Ort des H2A.Z-Austauschs durch MycER relativ zum Transkriptionsstart	72
3.2	Auswirkung gehemmter Expression von med24 auf Myc-Zielgene . . .	80
C.1	Ergebnisse der Reinigung des MIZ-1-Komplexes (I)	113
C.2	Ergebnisse der Reinigung des MIZ-1-Komplexes (II)	114
C.3	Ergebnisse der Reinigung des MIZ-1-Komplexes (III)	115
D.1	Expression aktivierter c-MYC-Zielgene nach <i>H2A.Z-knockdown</i>	117
D.2	Expression reprimierter c-MYC-Zielgene nach <i>H2A.Z-knockdown</i> . . .	118
D.3	Expression aktivierter c-MYC-Zielgene nach <i>med24-knockdown</i> I . . .	119
D.4	Expression aktivierter c-MYC-Zielgene nach <i>med24-knockdown</i> II . .	120
D.5	Expression aktivierter c-MYC-Zielgene nach <i>med24-knockdown</i> III . .	121
D.6	Expression reprimierter c-MYC-Zielgene nach <i>med24-knockdown</i> I . .	122
D.7	Expression reprimierter c-MYC-Zielgene nach <i>med24-knockdown</i> II .	123
D.8	Expression reprimierter c-MYC-Zielgene nach <i>med24-knockdown</i> III .	124
D.9	Expression reprimierter c-MYC-Zielgene nach <i>med24-knockdown</i> IV .	125
D.10	Expression reprimierter c-MYC-Zielgene nach <i>med24-knockdown</i> V .	126

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Struktur des Nukleosoms	2
1.2	Posttranslationale Modifikationen der Kernhistone	9
1.3	Untereinheiten des humanen Mediator-Komplexes	14
1.4	Modell der Transkriptionsaktivierung durch den Mediator-Komplex . . .	16
1.5	Der Transkriptionsfaktor c-MYC	17
1.6	Der Transkriptionsfaktor MIZ-1	21
3.1	Schema der Reinigungsstrategie	61
3.2	Blot-Analyse von Fraktionen der MIZ-1-Reinigung	62
3.3	Analyse von Fraktionen der MIZ-1-Reinigung (Silberfärbung)	63
3.4	Exogen exprimiertes c-MYC interagiert mit exogen exprimiertem FLAG-Mi2 β	65
3.5	c-MYC interagiert in embryonalen Nierenzellen mit IRS4	66
3.6	Austausch von H2A.Z durch MycER in Mausfibroblasten	67
3.7	Austausch von H2A.Z durch Myc und MycER in Rattenfibroblasten . .	68
3.8	Kinetik des H2A.Z-Austausches und der <i>ccnd2</i> -Expression durch MycER in Mausfibroblasten	69
3.9	Analyse des H2A.Z-Austauschs an verschiedenen Myc-Zielgenen in Mausfibroblasten (1)	70
3.10	Analyse des H2A.Z-Austauschs an verschiedenen Myc-Zielgenen in Mausfibroblasten (2)	71
3.11	shRNA-vermittelte Depletion von H2A.Z in U2OS-Zellen	73
3.12	Genomweite Auswirkung gehemmter Expression von <i>H2A.Z</i> auf MYC-Zielgene in humanen Osteosarkomzellen	73
3.13	Auswirkung gehemmter Expression von <i>H2A.Z</i> auf MYC-Zielgene in humanen Osteosarkomzellen	75
3.14	Auswirkung gehemmter Expression von <i>h2a.z</i> , <i>p400</i> und <i>srcap</i> auf die Induktion der <i>ccnd2</i> -Expression in Mausfibroblasten	76
3.15	Auswirkung gehemmter Expression von <i>h2a.z</i> auf die Kolonienbildung von Mausfibroblasten	77

3.16 Wachstumsarrest von murinen myeloiden Progenitoren durch gehemmte Expression von <i>h2a.z</i>	78
3.17 Genomweite Auswirkung gehemmter Expression von <i>med24</i> auf Myc-Zielgene in Mausfibroblasten	80
3.18 Auswirkung gehemmter Expression von Mediator-Untereinheiten auf Myc-Zielgene in Mausfibroblasten	81
3.19 Induktion der Zellzyklusprogression in Med24-depletierten Mausfibroblasten	82
3.20 Rekrutierung des Mediator-Komplexes an Promotoren von MYC-Zielgenen in Osteosarkomzellen	83
4.1 Modell für die Regulation der Transkription durch Inkorporation von H2A.Z	88
4.2 Modell der MYC-vermittelten Repression von MIZ-1-Zielgenen	90
E.1 pCDNA3	127
E.2 pSUPER.retro.puro	128

1 Einleitung

1.1 Chromatinstruktur

In der Zelle liegt eukaryotische DNA in einem Nukleoproteinkomplex vor, der als Chromatin bezeichnet wird. Dies hat Auswirkungen auf sämtliche Prozesse, in denen DNA eine Rolle spielt, da ihre Verpackung die Zugänglichkeit für weitere Faktoren bestimmt. Die Hauptproteinkomponente des Komplexes bilden die Histone; dies sind kleine, basische, evolutionär hochkonservierte Proteine [1]. Desweiteren sind auch Nichthistonproteine wie etwa Gerüstproteine, DNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren Teil des Nukleoproteinkomplexes. Chromatin kann strukturell und funktionell in Euchromatin und Heterochromatin unterteilt werden. Euchromatin umfaßt aktiv transkribierte, aufgelockerte Regionen, während Heterochromatin kondensiert, transkriptionell inaktiv und an der Bildung chromosomaler Strukturen beteiligt ist [2, 3].

1.1.1 Das Nukleosom

Die kleinste Verpackungseinheit eukaryotischer DNA ist das Nukleosom, das aus einem Oktamer von Histonproteinen und einem darum gewickelten DNA-Abschnitt mit einer Länge von ca. 146 Basenpaaren besteht [1]. Das Oktamer besteht aus den sogenannten Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4 in äquimolarem Verhältnis zueinander. Diese sind als ein $(\text{H3-H4})_2$ -Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimere organisiert. Die Kristallstruktur des Nukleosoms wurde von Luger und Kollegen gelöst (siehe Abb. 1.1 auf der nächsten Seite) [4]. Die Kernhistone besitzen eine dimerbildende zentrale Histonfaltungsdomäne von globulärer Form [5]. Aus der Kristallstruktur wird zudem ersichtlich, daß etwa 15–30 Aminosäurereste an den Aminotermi der Histone unstrukturiert vorliegen und aus der ansonsten sehr geordnet vorliegenden Nukleosomstruktur her-

ausstehen, sie werden als Histonschwänze bezeichnet. Das Histon H2A hat außerdem eine 37 Aminosäurereste große carboxyterminale Domäne, die aus dem Nukleosom heraussteht [6].

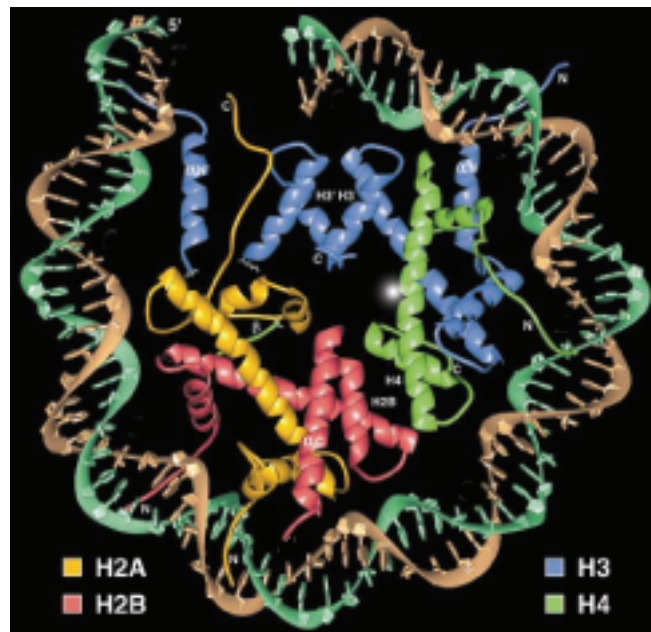


Abb. 1.1: Die Struktur des Nukleosoms. Bänder-Darstellung einer Hälfte des Kernpartikels nach Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2,8 Å. Gezeigt sind vier farblich voneinander abgegrenzte Histonmoleküle, 73 bp DNA sowie drei Helices eines H3-Moleküls der anderen Hälfte; nicht gezeigt sind die nicht mit dem Kernpartikel assoziierten Bereiche der Histonschwänze. Verändert nach [4].

1.1.2 Chromatinfasern

Isoliertes Chromatin erscheint bei elektronenmikroskopischer Betrachtung als Faser mit einem Durchmesser von 10 nm, diese wird analog zur Terminologie der Proteinstruktur auch als Primärstruktur des Chromatins bezeichnet [7]. Hochauflösende Aufnahmen der Faser zeigen, daß diese ein mit einer Perlenkette vergleichbares Aussehen besitzt, d.h. es gibt DNA-Bereiche, die nicht Teil eines Nukleosoms sind. Die DNA zwischen Nukleosomen, die man als *linker*-DNA bezeichnet, wird bei Säugetieren durch das *linker*-Histon H1 gebunden. Unterschiede der Länge der *linker*-DNA zwischen Nukleosomen haben Einfluß auf die Genregulation [1]. In der Nähe von Promotoren, regulatorischen Elementen und anderen besonderen Bereichen der DNA befinden sich Nukleosomen häufig an bestimmten Positionen relativ zu diesen.

Die nächsthöhere Strukturebene bezeichnet man als Sekundärstruktur des Chromatins, sie wird durch Kondensation der 10 nm-Faser zu einer 30 nm-Faser *in vitro* sichtbar; das Vorhandensein der Histonschwänze ist für diese Kondensation notwendig [6]. Die Faltung der 30 nm-Fasern zu Chromosomen bildet die Tertiärstruktur des Chromatins, deren Ausrichtung zueinander und zu weiteren Merkmalen des Zellkerns die Quartärstruktur [7].

1.1.3 Histonvarianten

In den meisten Organismen gibt es mehrere Kopien der Histongene, welche jeweils in ihrer Sequenz sehr ähnlich sind und hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert werden [8]; diese bezeichnet man wegen der starken strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit ihrer Genprodukte zueinander als homomorphe Histonvarianten [5]. Sie kodieren für einen großen Anteil der Histone der Zelle. Zusätzlich existieren nichtallelische Varianten der Kernhistone, deren Gene normalerweise als Einzelkopie im Genom vorliegen, die in ihrer Aminosäuresequenz deutliche Unterschiede zu den Kernhistonen aufweisen [8] und deswegen als heteromorphe Histonvarianten bezeichnet werden [5]. Ihre Expression kann während des gesamten Zellzyklus stattfinden; ihre Gene enthalten im Gegensatz zu denen der Kernhistone Introns, die Transkripte werden oft polyadenyliert [8]. Tab. 1.1 auf der nächsten Seite zeigt einige charakterisierte Histonvarianten aus verschiedenen Spezies und ihre Funktionen.

1.1.3.1 H2A.Z

H2A.Z ist eine Variante des Kernhistons H2A und stellt etwa 5–10 % der zellulären H2A-Moleküle [9]. Seine Aminosäuresequenz ist zwischen den Spezies hochkonserviert (ca. 90 %), weist jedoch zu H2A nur eine Übereinstimmung von ca. 60 % auf [10]. Strukturell unterscheidet es sich vom kanonischen H2A-Molekül durch den Austausch dreier konservierter Aminosäurereste in der Bindedomäne zum (H3-H4)₂-Tetramer, was — durch den Verlust dreier Wasserstoffbrückenbindungen gegenüber der Bindungsoberfläche zwischen kanonischem H2A und H3 — den Zusammenhalt des Nukleosoms schwächt. Ein weiterer Unterschied ist durch zwei außen gelegene Histi-dinreste gegeben, welche zur Bindung eines Metallions dienen könnten. Schließlich hat H2A.Z eine erweiterte saure Region, die für die Bindung von H4-Schwänzen oder

Variante	Spezies	Chromatineffekt	Funktion
H1 ^o	Maus	Kondensation	Repression der Transkription
H5	Huhn	Kondensation	Repression der Transkription
SpH1	Seeigel	Kondensation	Chromatinpackung
H1t	Maus	Öffnung	Histonaustausch, Rekombination?
macroH2A	Vertebraten	Kondensation	Inaktivierung des X-Chromosoms
H2ABbd	Vertebraten	Öffnung	Aktivierung der Transkription
H2A.X	ubiquitär	Kondensation	DNA-Reparatur / Rekombination / Repression der Transkription
H2A.Z	ubiquitär	Öffnung / Schließen	Aktivierung/Repression der Transkription, Chromosomentrennung
SpH2B	Seeigel	Kondensation	Chromatinpackung
CenH3	ubiquitär	?	Kinetochorbildung/-funktion
H3.3	ubiquitär	Öffnung	Transkription

Tab. 1.1: Histonvarianten und ihre Funktionen. Übernommen aus Kamakaka und Biggins 2005 [8].

Nichthistonproteinen von Wichtigkeit sein könnte [11]. Man geht davon aus, daß im Unterschied zum kanonischen Nukleosom die Wechselwirkung zwischen den beiden H2A-Molekülen verschieden ist. Die Kristallstruktur von H2A.Z legt nahe, daß innerhalb eines Nukleosoms H2A und H2A.Z nicht gleichzeitig existieren, jedoch ist dies *in vitro* der Fall. Für die Situation *in vivo* gibt es bislang keine Studien. Untersuchungen zur Stabilität H2A.Z-enthaltender Nukleosomen führten zu widersprüchlichen Ergebnissen, d.h. *in vitro* zeigt sich in einigen Systemen eine erhöhte, in anderen eine verringerte Stabilität im Vergleich zum kanonischen Nukleosom. *In vitro* rekonstituierte Nukleosomen, die H2A.Z enthalten, zeigen eine erhöhte thermische Mobilität auf DNA-Strängen, und es gibt Hinweise, daß sie auf der DNA andere Positionen einnehmen als kanonische Nukleosomen. Chromatinfasern mit H2A.Z-haltigen Nukleosomen zeigen eine stärkere Faltung, das Entstehen stärker kondensierter Strukturen ist jedoch benachteiligt. Außerdem fördert H2A.Z die Heterochromatin-Protein 1 α (HP1 α)-abhängige Faltung von Chromatinfasern. Dieser Mechanismus könnte auch *in vivo* relevant sein, da HP1 α und H2A.Z in der frühen Entwicklung der Maus in perizentrischem Heterochromatin kolokalisiert sind [10].

In *S.cerevisiae* wird das zu H2A.Z orthologe Protein Htz1 genannt. Eine Deletion von *htz1* führt zu einer Verlangsamung des Zellwachstums, Sensitivität gegenüber Formamid bei 28 °C und Letalität durch Formamid bei 37 °C [9].

In *Drosophila* gibt es eine Histonvariante mit dem Namen H2Av, welche strukturelle und funktionelle Merkmale der H2A-Varianten X und Z aus anderen Organismen vereint [12]. H2Av ist für die Lebensfähigkeit unentbehrlich [13].

Bei Säugetieren wird H2A.Z durch ein essentielles Gen kodiert, dessen homozygote Deletion in der Maus dazu führt, daß Embryonen das Gastrulationsstadium nicht vollenden können [14]. Auch in *Tetrahymena thermophila* und *Xenopus laevis* sind Deletionen von H2A.Z letal [13].

Die H2A.Z zugeschriebenen Funktionen werden kontrovers diskutiert. Es ist an vielen biologischen Prozessen wie etwa Genaktivierung, Chromosomentrennung, Stilllegung von Heterochromatin und Vorantreiben des Zellzyklus beteiligt [10, 13], wobei in verschiedenen Organismen verschiedene Funktionen beschrieben wurden. Desweiteren ist bei der Krebsentstehung beim Menschen in verschiedenen Krebstypen eine Überexpression von H2A.Z, v.a. im Stadium der Metastasierung, beschrieben worden [10, 15].

1.1.4 Histonaustausch

Das Nukleosom ist ein sehr stabiler Protein-DNA-Komplex. Trotzdem ist Chromatin eine sehr dynamische Struktur, welche sich in ständigem Wandel befindet. Die Windung der DNA um Nukleosomen und die Bildung weiterer Chromatinstrukturen stellt eine Barriere für zelluläre Maschinerien bei der Ausübung von Prozessen wie Transkription, Reparatur, Replikation und Rekombination dar. Um diese Prozesse zu regulieren, greift die Zelle auf Mechanismen zurück, die Änderungen in Histon-DNA- und Histon-Histon-Wechselwirkungen innerhalb und zwischen Nukleosomen bewirken, um Zugänglichkeit der DNA für Proteinkomplexe zu gewährleisten. Derartige Mechanismen sind ATP-abhängige Umgestaltung des Chromatins, posttranslationale Modifikationen der Histone und der Austausch kanonischer Histone gegen nichtallelische Histonvarianten [10].

1.1.4.1 Austausch und Lokalisation von H2A.Z

Der Austausch von H2A und seiner Varianten geschieht durch das Ersetzen eines H2A-H2B-Heterodimers. Auch der Verlust eines Heterodimers bei der Transkription

wurde beschrieben [16]; die RNA-Polymerase II (siehe Abschnitt 1.2.2 auf Seite 11) bindet bevorzugt an solche Nukleosomen und kann selbst einen solchen Dimer-Verlust bewirken. Das Entfernen und auch das Ersetzen eines Heterodimers durch ein anderes kann durch sogenannte Histon-Chaperone wie z.B. Nap1 (*nucleosome assembly protein 1*) aus *S.cerevisiae* geschehen, welches auf ATP-unabhängige Weise H2A-H2B-Dimere entfernt.

Auch ATP-abhängige Chromatin-Umgestaltungs Komplexe wie SWI/SNF (*switching deficient/sucrose nonfermentable*), RSC (*remodel the structure of chromatin*) und ISWIb (*imitation switch b*) können Histondimere entfernen oder austauschen. H2A.Z wird in *S.cerevisiae* durch den SWR1 (Swi2 ATPase domain-related-1)-Komplex (siehe Tab. 1.2 auf der nächsten Seite), welcher die Swi2/Snf2-ähnliche ATPase Swr1 enthält, *in vivo* und *in vitro* in Chromatin bzw. rekonstituierte Nukleosomen-DNA-Strukturen eingesetzt. Dies kann sowohl in transkribierten als auch in nicht transkribierten Regionen geschehen [16]. Nap1 ist u.a. eine Untereinheit des SWR1-Komplexes und bindet an H2A.Z-H2B-Dimere.

In *S.cerevisiae* kann H2A.Z ebenfalls durch das Histonchaperon Chz1 (Chaperon für H2A.Z-H2B) in Chromatin eingesetzt werden, d.h. sowohl Nap1 als auch Chz1 können an H2A.Z-H2B-Dimere binden. Werden die für sie kodierenden Gene deletiert, können allerdings andere Proteine diese Funktion ersetzen [10].

Der SWR1-Komplex hat gemeinsame Untereinheiten mit dem Histonacetyltransferasekomplex NuA4 (Nukleosom-Acetyltransferase von H4; siehe Abschnitt 1.1.6 auf Seite 9). Außerdem enthält der Tip60 (Tat-interagierendes Protein, 60 kDa)-Komplex aus *D.melanogaster* die ATPase Domino vom Swr1-Typ sowie die Tip60-Histonacetyltransferase, die ein Ortholog der Esa1p (essentielle Sas2-verwandte Acetyltransferase 1)-Untereinheit des NuA4-Komplexes ist, d.h. der *Drosophila*-Tip60-Komplex scheint sowohl Funktionen des SWR1- und des NuA4-Komplexes aus der Bäckerhefe wahrzunehmen. Bei Säugetieren gibt es zwei dem SWR1-ähnliche Komplexe, welche als SRCAP (Snf2-verwandtes CREBBP-Aktivatorprotein)- bzw. Tip60-Komplex bezeichnet werden. Der SRCAP-Komplex enthält die zu Swr1 orthologe ATPase SRCAP, der Tip60-Komplex kann die zu Swr1 orthologe ATPase P400 enthalten [16]. *In vitro* konnte eine Inkorporation von H2A.Z in Chromatinfasern durch den SRCAP-Komplex gezeigt werden [17]. Die Zusammensetzungen der entsprechenden Komplexe suggerieren einen Zusammenhang zwischen Histonacetylierung und dem Einsetzen von H2A.Z [16]. Bei der DNA-Schadensantwort acetyliert der *Drosophila*-Tip60-Komplex

in vitro die phosphorylierte Form der Histonvariante H2Av, welche Eigenschaften von H2A.X und H2A.Z besitzt, und tauscht sie gegen unmodifiziertes H2Av aus [12]. In Tab. 1.2 sind Komplexe, die H2A.Z austauschen und modifizieren können, und verwandte Komplexe aufgeführt.

SWR1 Hefe	SRCAP Mensch	dTip60 Fruchtfliege	TIP60 Mensch	NuA4 Hefe	Domänen und Funktionen
Swr1	SRCAP	Domino	P400	Eaf1	Swi2/Snf2-ATPase (außer Eaf1), SANT-Domäne (außer SRCAP)
Arp6 Swc6 Htz1	Arp6 ZnF-HIT1 H2A.Z	H2Av	?	?	aktinverwandtes Protein Zinkfinger, HIT-Domäne Transkription, Begrenzung von Heterochromatin zwei Bromodomänen
Bdf1 Swc3 Swc5 Swc7 Act1	Aktin	dBrd8 Act87E	Brd8 Aktin	Act1	Aufbau der Kernhülle, Tran- skription, mRNA-Prozessierung, Kernexport
Arp4 Rvb1	BAF53a TIP49a	BAP55 dPontin	BAF53a TIP49a	Arp4	aktinverwandtes Protein AAA-ATPase; DNA-Reparatur, Rekombination, Transkription
Rvb2	TIP49b	dReptin	TIP49b		AAA-ATPase; DNA-Reparatur, Rekombination, Transkription
Swc4	DMAP1	dDMAP1	DMAP1	Eaf2	SANT-Domäne, Repression der Transkription
Swc2 Yaf9	YL1 GAS41	dYL-1 dGas41	YL1 GAS41	Yaf9	DNA-bindend YEATS-Familie, aktiviert Tran- skription, essentiell für die Zelle
		dTra1 dTip60	TRRAP TIP60	Tra1 Esa1	FAT- und PI3K-Domäne HAT der MYST-Familie, Chromodomäne, acetyliert H2A.Z
		dEaf6 dMRG15 dMrgBP E(Pc)	FLJ11730 MRG15 MRGBP EPC1	Eaf6 Eaf3 Eaf7 Epl1	Chromodomäne bindet MRG15 Repressor der Transkription, Polycomb-Protein
		dIng3	ING3	Eaf4 Eaf5	PHD-Finger, Tumorsuppressor der ING-Familie

Tab. 1.2: H2A.Z-bindende und verwandte Komplexe. Verändert nach Jin *et al.* 2005 und Zlatanova und Thakar 2008 [10, 16].

Genomische Lokalisationsstudien von H2A.Z in der Bäckerhefe zeigten, daß sich diese Histonvariante stromaufwärts von Promotor-Regionen, in intergenischen promotorfreien Regionen und in intergenischen Regionen zwischen unterschiedlich aktiven Genen befinden kann; ein Großteil der H2A.Z-Loci befinden sich in Promotor-Regionen. Es wurde berichtet, daß hier die etwa 150 bp lange, 200 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle gelegene nukleosomfreie Region von zwei H2A.Z-haltigen und definiert positionierten Nukleosomen flankiert wird, welche häufigem Austausch unterliegen. Zudem tritt H2A.Z in transkribierten Regionen sowie an Telomeren und in anderen nichttranskribierten Regionen auf. Über letztere gibt es Daten aus Zellen höherer Eukaryoten; H2A.Z tritt zusammen mit dem Zinkfingerprotein CTCF (CCCTC-bindender Faktor) und der Histonvariante H3.3 in Isolator-Regionen auf, was vermutlich die Ausbreitung von Heterochromatin-Regionen verhindert.

Die Funktion von H2A.Z bezüglich der Regulation der Transkription in *S.cerevisiae* kann sowohl positiv als auch negativ sein. Die Ergebnisse der meisten Studien deuten darauf hin, daß die Anwesenheit von H2A.Z eine inverse Beziehung zu transkriptioneller Aktivität hat. Weiterhin gibt es Hinweise, daß in den Promotoren aktiver Gene und in Isolator-Regionen an Lysin 14 acetyliertes H2A.Z vorliegt. Außerdem wird vermutet, daß die Anwesenheit von H2A.Z in Promotor-Regionen als transkriptionelles Gedächtnis fungiert, d.h. kürzlich reprimierte Promotoren verfügen über H2A.Z, nicht jedoch aktive oder über lange Zeit stille Promotoren [10, 13].

H2A.Z hat klinische Bedeutung, wie seine Überexpression in verschiedenen Tumoren [13] sowie seine Anreicherung an Chromosomenbruchstellen [18] zeigen. Desweiteren wurde gezeigt, daß H2A.Z in *S.cerevisiae* eine Rolle bei der Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie (siehe Abschnitt 1.2.3 auf Seite 12) [10] und des Mediator-Komplexes (siehe Abschnitt 1.3 auf Seite 14) und anderer chromatinmodifizierender Komplexe spielen kann [19].

1.1.5 Histonmodifikationen

Wie viele zelluläre Proteine können auch Histone posttranslational modifiziert werden; mögliche Modifikationen sind Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und ADP-Ribosylierung [6]. Diese Modifikationen betreffen hauptsächlich Aminosäurereste der Histonschwänze, werden durch kontextspezifische enzymatische Reaktionen verursacht und bilden auf kombinatorische Weise den

Histon-Code, der durch mit den modifizierten Resten interagierende Proteinmodule gelesen und wiederum modifiziert werden kann [20, 21]. Beispiele für derartige Proteinmodule sind die Bromodomänen, welche an acetylierte Lysinreste binden können, und Chromodomänen, welche an methylierte Lysinreste binden können [22]. Abb. 1.2 zeigt beispielhaft einige mögliche Modifikationen der Kernhistone.

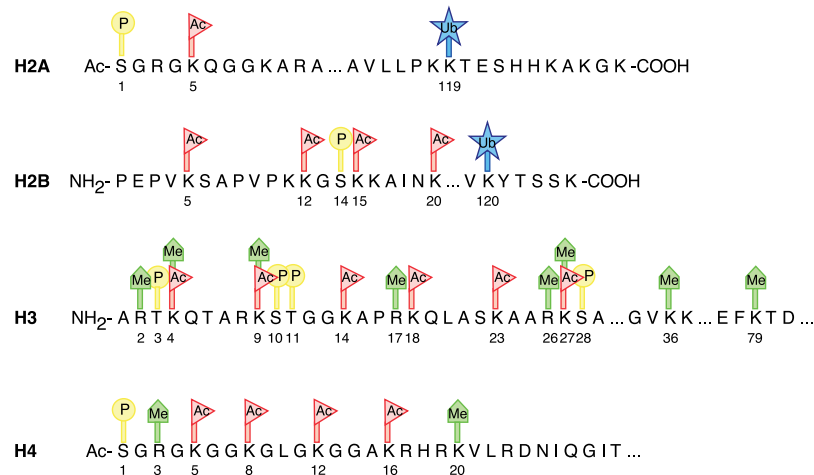


Abb. 1.2: Posttranslationale Modifikationen der Kernhistone. Die farbigen Markierungen stellen bekannte Modifikationen der jeweiligen Aminosäurereste dar. Die Histonschwänze können an Lysin- und Argininresten methyliert (grüne Fünfecke), an Serin- und Threoninresten phosphoryliert (gelbe Kreise) und an Lysinresten ubiquitiniert (blaue Sterne) und acetyliert (rote Dreiecke) werden. Verändert nach [6].

1.1.6 Histonacetyltransferasen

Das Verständnis der Bedeutung der posttranslationalen Modifikationen der Histone wurde durch die Identifizierung der für sie verantwortlichen Enzyme entscheidend erweitert. Die Acetylierung von Histonproteinen an Lysinresten ist eine der am besten untersuchten Modifikationen und geschieht durch die enzymatische Aktivität sogenannter Histonacetyltransferasen (HATs). Die Acetylierung von Histonschwänzen an Lysinresten hat zwei Funktionen: einerseits neutralisiert sie deren positive Ladungen und schwächt so die Histon-DNA- und Histon-Histon-Wechselwirkungen, andererseits dient sie als epigenetische Markierung, die von Proteinmodulen wie z.B. den Bromodomänen erkannt werden und so Einfluß auf die Genexpression nehmen kann. HATs liegen in großen Proteinkomplexen vor und katalysieren die Acetyl-CoA-

abhängige Acetylierung der ϵ -Aminogruppen spezifischer Lysine von Histonen, Transkriptionsfaktoren und anderen Kernproteinen [23, 24].

1.1.6.1 Der NuA4/Tip60-Komplex

Der evolutionär hochkonservierte NuA4/Tip60-Komplex enthält eine Histonacetyltransferase der MYST (MOZ-Ybf2/Sas3-Sas2-Tip60)-Familie, Esa1 in *S.cerevisiae* bzw. TIP60 in *H.sapiens*, welche die Histone H4 und H2A acetylieren können. In der Bäckerhefe bindet er an einen Großteil der Promotoren der RNA-Polymerase II (siehe Abschnitt 1.2.2 auf der nächsten Seite). Bei Vielzellern enthält der Komplex neben der HAT- mindestens noch eine weitere enzymatische Aktivität, die der ATP-abhängigen Chromatinumgestaltung durch P400, und scheint so zwei Komplexen aus *S.cerevisiae* zu entsprechen, NuA4 und SWR1. Er hat eine ähnliche Zusammensetzung wie der humane SRCAP-Komplex (siehe auch Abschnitt 1.1.4.1 auf Seite 5). Seine Funktionen betreffen die DNA-Schadensantwort und die Transkriptionskontrolle [25]. TIP60 wurde ursprünglich als HIV-Tat-interagierendes Protein identifiziert. Ein zentraler Bestandteil des TIP60-Komplexes ist das Protein TRRAP, welches auch in anderen HAT-Komplexen wie z.B. PCAF und GCN5 vorhanden ist [26]. Es gibt Hinweise auf die Existenz eines Komplexes, welcher kein TIP60 enthält, dieser wird P400-Komplex genannt [25, 27].

Kernrezeptoren können direkt an TIP60 binden; TIP60 fungiert hauptsächlich als deren Koaktivator, kann in diesem Zusammenhang allerdings auch reprimierend wirken. Der TIP60-Komplex kann bei der Transkriptionsaktivierung durch MYC-Proteine (siehe Abschnitt 1.3.2 auf Seite 18) über TRRAP rekrutiert werden [26]. Weitere Transkriptionsfaktoren, die den Komplex rekrutieren können, sind beispielsweise NF κ B (nukleärer Faktor κ B), E2Fs (Transkriptionsfaktoren des Adenovirus-E2-Promotors), P53 (Protein mit 53 kDa) und STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). Meist spielt der Komplex eine aktivierende Rolle [25].

1.2 Transkription

Sämtliche genetischen Informationen von Lebewesen sind in der Basenabfolge ihrer DNA-Sequenzen kodiert. Nach Umschreibung in RNA (Transkription) erfolgt die Übersetzung in eine Aminosäuresequenz bei der Proteinbiosynthese (Translation). Dieses Modell der Genexpression aller Prokaryoten und Eukaryoten wird als das zentrale Dogma der Molekularbiologie bezeichnet [28]. Bei Eukaryoten werden viele Transkripte im Zellkern prozessiert und erst als reife mRNA ins Zytoplasma transportiert, wo die Translation stattfindet [29].

1.2.1 Die RNA-Polymerasen

Die Synthese von RNA geschieht in der eukaryotischen Zelle durch die mitochondriale RNA-Polymerase (mtRNAP) sowie durch die nukleären RNA-Polymerasen I, II und III, die nichtredundante, große Multiproteinkomplexe aus mehreren Untereinheiten sind [30]; außerdem wurde eine vierte RNA-Polymerase beschrieben, welche durch ein alternatives Transkript der mitochondrialen RNA-Polymerase kodiert wird und ebenfalls im Zellkern lokalisiert ist [31]. Diese aus nur einem Polypeptid bestehende RNA-Polymerase IV kann eine bestimmte Gruppe von mRNAs synthetisieren.

Die RNA-Polymerase I befindet sich im Nukleolus, wo sie die Gene für 18S-, 5,8S- und 28S-ribosomale RNAs (rRNAs) transkribiert. Das 5S-rRNA-Gen und alle tRNA-Gene werden durch die RNA-Polymerase III abgelesen, welche im Nukleoplasma lokalisiert ist und desweiteren einige kleine RNA-Moleküle anderer Funktion synthetisiert.

1.2.2 Die RNA-Polymerase II

Die RNA-Polymerase II (RNAPII) befindet sich ebenfalls im Nukleoplasma und synthetisiert Vorläufermoleküle der Boten-RNA (prä-mRNAs), d.h. sorgt für die Expression nahezu aller proteinkodierender Gene. Die spezifische Regulation der mRNA-Synthese ist die finale Konsequenz vieler zellulärer Signalwege [32]. Außerdem synthetisiert RNAPII weitere kleine RNA-Moleküle wie etwa des Spleißapparats, welcher durch Ausschneiden von Intron-Sequenzen aus prä-mRNAs eine Rolle bei der mRNA-Reifung hat [29]. Die drei eukaryotischen RNA-Polymerasen sind homolog zueinander,

jedoch verfügt die RNA-Polymerase II über eine besondere carboxyterminale Domäne (CTD) ihrer 220 kDa-Untereinheit, welche phosphoryliert werden kann und deren Phosphorylierungszustand die Aktivität des gesamten Enzyms reguliert [30].

Die Synthese von prä-mRNAs durch RNAPII beginnt häufig an einem definierten Ort des Promotors, der Transkriptionsstartstelle. Stromaufwärts, d.h. 5' von ihr gelegen oder sie umgebend, befindet sich häufig ein konserviertes Sequenzelement; beschriebene Elemente dieser Art sind die TATA-Box (diese hat die Konsensus-Sequenz TATAA/TAA/TA/G) und der Initiator (Inr) mit der weniger konservierten Konsensus-Sequenz YYA⁺¹NT/AYYY, wobei Y ein Pyrimidin und N eine beliebige Base darstellt. Die Transkription kann aber auch an mehreren Stellen innerhalb einer ausgeweiteten Region beginnen; die meisten der entsprechenden Gene besitzen eine 20–50 bp lange CpG-Insel, d.h. eine guanin- und methylcytosinreiche Region, innerhalb von 100 bp stromaufwärts der Startstelle [29].

1.2.3 Der Präinitiationskomplex

Die Isolation von RNAPII-assoziierten Proteinen ergab, daß das Enzym zusätzlich zu seinen Untereinheiten sechs weitere Proteine bindet, welche als generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs) bezeichnet werden [31]. Diese werden im einzelnen TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF bzw. TFIIF genannt. Der Komplex aus RNAPII und den GTFs, welcher sich als basale Transkriptionsmaschinerie an sogenannten Kern-Promotoren bilden kann, trägt die Bezeichnung Präinitiationskomplex (PIC). Homolog zum Ablauf bei Prokaryoten umfaßt die eukaryotische Transkription durch RNAPII die Schritte PIC-Aufbau, PIC-Aktivierung (Schmelzen der DNA-Stränge), Initiation, Promotor-Freigabe, Elongation und Termination.

Bestandteile eines Kern-Promotors sind minimale Elemente der DNA, die notwendig und ausreichend für die korrekte Initiation der Transkription durch den PIC in rekonstituierten zellfreien Systemen sind. Unter den GTFs ist nur TFIID dazu fähig, sequenzspezifisch an Promotor-DNA zu binden. Daraufhin erfolgt schrittweise eine Bindung weiterer Komponenten des PIC, nach dessen Aufbau das Schmelzen der DNA und die Initiation stattfindet [33]. *In vitro* erfolgt diese basale Transkriptionsaktivität jedoch nicht reguliert, d.h. das System zeigt keine Antwort auf Aktivatoren und Repressoren [32].

1.2.4 Transkriptionsfaktoren

Die Genexpression kann an jedem ihrer Schritte kontrolliert werden, um zu einer differentiellen Produktion von Proteinen in verschiedenen Zelltypen, Entwicklungsstadien oder als Reaktion auf externe Bedingungen zu führen. Der erste Schritt — die Initiation der Transkription — ist derjenige, dessen Regulation der wichtigste Mechanismus für die Kontrolle der Genexpression ist. Eukaryotische proteinkodierende Gene besitzen proteinbindende DNA-Sequenzen, die als Transkriptionskontrollregionen bezeichnet werden und Promotoren sowie Kontrollelemente nahe der Transkriptionsstartstelle und weiter entfernte Sequenzen beinhalten, d.h. es gibt promotor-proximale und -distale Kontrollelemente. Proteine, die an die genannten Sequenzen binden und die Transkription der betroffenen Gene regulieren können, bezeichnet man als Transkriptionsfaktoren [29].

1.2.5 Der Mediator-Komplex

Studien in *S.cerevisiae* ergaben, daß zusätzlich zu den isolierten PIC-Komponenten eine krude Fraktion, d.h. ein weiterer Faktor, notwendig war, um regulatorische Aktivität auf die basale Transkription auszuüben. Diese Aktivität wurde als Mediator bezeichnet. Die Reinigung des aktiven Faktors zeigte, daß der Mediator einen Komplex aus mehr als 20 Untereinheiten darstellt, von denen viele hochkonserviert sind. Der Mediator-Komplex ist *in vivo* notwendig für die Transkription nahezu aller RNAPII-Promotoren und kann die Transkription sowohl in positiver als auch in negativer Weise regulieren [32].

1.2.5.1 Die Struktur des Mediator-Komplexes

Reinigungen des Mediatorkomplexes und strukturelle Untersuchungen in verschiedenen Organismen ergaben, daß der Komplex aus drei Modulen besteht, nämlich Kopf, Mitte und Schwanz. Außerdem kann ein weiteres Modul reversibel binden. Abb. 1.3 auf der nächsten Seite stellt den Komplex in vereinfachter Weise grafisch dar. Die Namensgebung erfolgt bis auf die Ausnahmen CDK8 und Zyklin C nach dem Schema MEDxx, wobei xx die willkürliche laufende Nummer der Untereinheit darstellt. Ältere Bezeichnungen sind teilweise noch in Gebrauch.

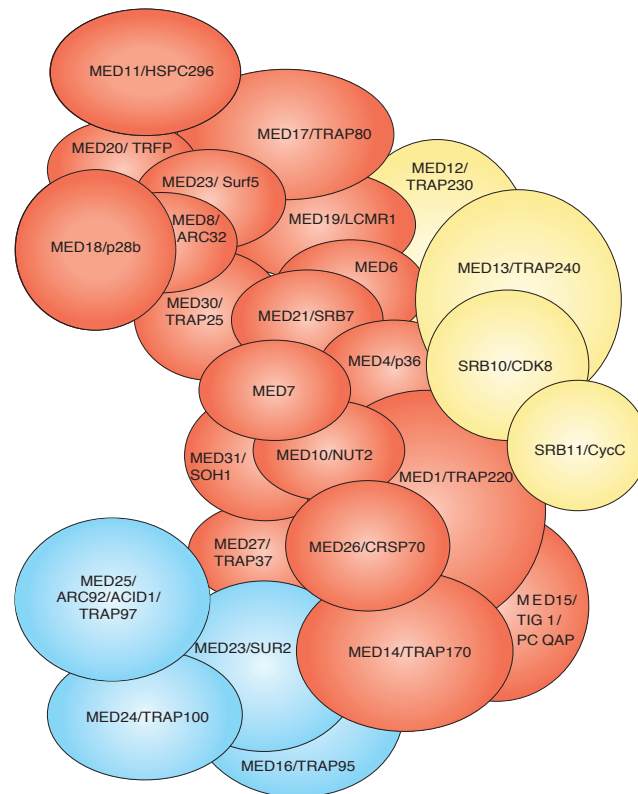


Abb. 1.3: Untereinheiten des humanen Mediator-Komplexes. Abgebildet ist eine Zusammenstellung von Untereinheiten (bezeichnet nach der aktuellen Nomenklatur und nach älteren), deren Positionen zueinander teils willkürlich, teils basierend auf binären Interaktionsdaten sind. Rot dargestellt sind jene, die in den meisten Kernkomplexpräparationen enthalten sind; diese bilden nach Vergleich mit kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Mediator-Komplexes aus *S.cerevisiae* wahrscheinlich Kopf- und Mittelmodul des Komplexes. Blau dargestellte Untereinheiten sind locker mit dem Komplex assoziiert und sind wahrscheinlich das Äquivalent des Schwanzmoduls des Hefe-Mediators. Das gelb dargestellte Modul ist nicht mit dem reinen Kernkomplex (rot), jedoch mit dem intakten Mediator assoziiert. Nach Malik und Roeder 2005 [34].

Die Zusammensetzung des Komplexes ist wahrscheinlich von gewisser Variabilität, d.h. das Vorhandensein mancher Untereinheiten ist nicht zwingend erforderlich, und die Bindung einiger kann die Bindung anderer ausschließen. Für verschiedene Präparationen des reinen Komplexes mit definierter Zusammensetzung existieren eigene Bezeichnungen; ein Übersichtsartikel von Conaway *et al.* [35] enthält eine ausführliche Aufstellung. Einige dieser Interaktionsdaten spiegeln das Vorhandensein strukturell und funktionell unterschiedlicher Komplexe in der Zelle wider. Die Untereinheiten MED23, MED24 und MED16 könnten ein fakultatives Modul sein, da Komplex-

präparationen aus Mauszellen, welche durch Gendelektion bzw. -inaktivierung defizient für Med23 oder Med24 sind, jeweils alle drei Untereinheiten nicht enthalten. MED12, MED13, CDK8 und Zyklin C bilden ein weiteres fakultatives Modul (hier CDK8-Modul genannt), welches sich sowohl genetisch, funktionell als auch physikalisch von Kernkomplex trennen läßt [34].

1.2.5.2 Die Funktion des Mediator-Komplexes

In vitro wurde gezeigt, daß der Mediator die aktivatorabhängige Transkription von DNA-Matrizen erleichtern kann. Der genaue Mechanismus der Regulation der RNAPII-Transkription durch den Mediator-Komplex ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Er beinhaltet Interaktionen zwischen dem Mediator, transkriptionellen Aktivatoren und Repressoren, RNAPII, GTFs und anderen Kofaktoren. Als erster Schritt wird, angeregt durch eine Gruppe von Kofaktoren, die Struktur des Chromatins, welches wegen seiner engen Packung von DNA-Protein-Komplexen eine Barriere für die Zugänglichkeit für weitere Faktoren darstellt, durch Mobilisierung promotornaher Nukleosomen aufgelockert, woraufhin der PIC-Aufbau stattfinden kann. Der Mediator-Komplex spielt hauptsächlich beim PIC-Aufbau und bei der Modulation der Aktivität der RNAPII eine Rolle [34].

Die Rekrutierung des Mediator-Komplexes durch Aktivatoren wurde v.a. für Kernrezeptoren gezeigt, beispielsweise PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ), der *via* MED1 an den Komplex bindet, aber auch für andere Faktoren, z.B. VP16 *via* MED25 und MED17 oder STAT2 *via* MED14 [34, 35]. D.h. es gibt Hinweise, daß Faktoren an verschiedene Untereinheiten des Mediator-Komplexes binden, um eine Regulation der Transkription zu bewirken.

Repression der Transkription durch den Mediator-Komplex ist ebenfalls möglich, wurde bislang jedoch weniger gut charakterisiert. Es gibt Hinweise darauf, daß einige Untereinheiten des Mediator-Komplexes in *S.cerevisiae*, v.a. MED12, MED13, CDK8 und Zyklin C, die Transkription in negativer Weise regulieren [34] und die Interaktion des Komplexes mit RNAPII sterisch blockieren können [36]. Das Ortholog von MED12 in *C.elegans* kann einen β -Catenin-abhängigen Signalweg reprimieren [34]. Trotz dieser Hinweise ist es möglich, daß der Mediator-Komplex mit gebundenem CDK8-Modul

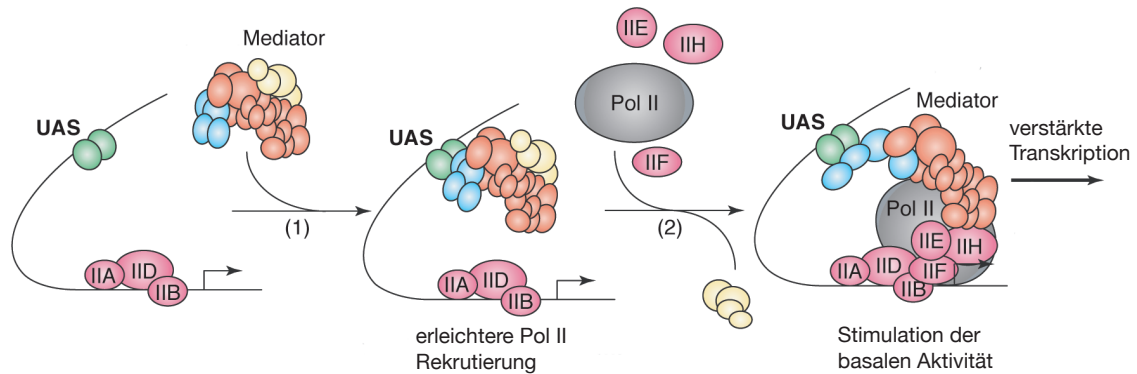


Abb. 1.4: Modell der Transkriptionsaktivierung durch den Mediator-Komplex. Aktivatoren der Transkription binden stromaufwärts gelegene aktivierende Sequenzen (UAS, *upstream activating sequence*) und rekrutieren den Mediator-Komplex (1). Der Mediator-Komplex erleichtert daraufhin die Rekrutierung von RNAPII während des PIC-Aufbaus (2), dies könnte mit einem Verlust seines CDK8-Moduls einhergehen. Im weiteren könnte der so umgestaltete Mediator-Komplex stimulatorische Effekte auf den PIC ausüben und nachfolgend den erneuten PIC-Aufbau bei der Reinitiation der Transkription fördern. Verändert nach Malik und Roeder 2005 [34].

auch an der Aktivierung der Transkription beteiligt sein kann, wie durch Ergebnisse neuerer Studien in Hefe [37,38] und in humanen Zellsystemen postuliert wurde [39,40].

1.3 c-MYC

Vennstrom *et al.* identifizierten das nukleäre Phosphoprotein c-MYC als zelluläres Homolog des Genprodukts des v-MYC-Onkogens des avianen Myelocytomatosevirus MC29 [41]. Die MYC-Genfamilie besteht bei Säugetieren aus den Mitgliedern c-MYC, N-MYC, L-MYC, S-MYC und B-MYC. B-MYC weist lediglich in seinem N-terminalen Bereich starke Homologie zu den anderen MYC-Proteinen auf. [27]. c-MYC, N-MYC und L-MYC sind Proto-Onkogene, d.h. sie können an der Entstehung von Tumoren beim Menschen beteiligt sein. Dies geschieht meistens durch eine Erhöhung der MYC-Proteinmenge v.a. durch transkriptionale oder auch durch posttranslationale Mechanismen. Bei der Tumorentstehung spielt c-MYC die wichtigste Rolle.

Die homozygote Inaktivierung von c-myc in der Maus führt zu mehreren Abnormalitäten und schließlich zum Tod der Embryonen zwischen Tag 9,5 und Tag 10,5 ihrer Entwicklung [42]. Dies geschieht aufgrund einer fehlerhaften Entwicklung der Plazen-

ta; eine homozygote Inaktivierung von *c-myc* im Epiblasten führt zu einer korrekten Plazentabildung und zeigt, daß c-Myc im Embryo ausschließlich für das Überleben von Erythroblasten und die Funktion hämatopoetischer Stammzellen notwendig ist; alle anderen Zelltypen scheinen bis zum Tod der Embryonen normal zu proliferieren. Der Verlust von c-Myc im Epiblasten führt zu einem Sterben zwischen E11,25 und E11,75 [43].

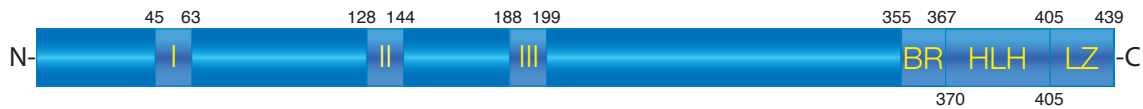


Abb. 1.5: Der Transkriptionsfaktor c-MYC. Der aminoternale Bereich enthält drei hochkonservierte Elemente, die als Myc-Boxen I bis III bezeichnet werden. Der C-Terminus enthält die basische Helix-Loop-Helix/Leuzinzipper(bHLH-LZ)-Domäne. Die die einzelnen Abschnitte eingrenzenden AS-Reste sind jeweils aufgeführt. Verändert nach Adhikary und Eilers 2005 [27].

Abb. 1.5 gibt einen Überblick über funktionell relevante Sequenzabschnitte des Proteins. Es besteht aus 439 Aminosäure(AS)resten, hat ein Molekulargewicht von 64 kDa, gehört zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper (bHLH-LZ)-Proteine und verfügt über ein Kernlokalisierungssignal [27].

1.3.1 DNA-Bindung durch c-MYC

Als Heterodimer mit dem in der Zelle im stöchiometrischen Überschuß vorliegenden Protein MAX (MYC-assoziiierter Faktor X) kann c-MYC an DNA binden und fungiert als Transkriptionsfaktor. Die Heterodimerisierung geschieht über das bHLH-LZ-Motiv. Die Bindung des Dimers an DNA erfolgt an sogenannten E-Box-Sequenzen, deren kanonische Sequenz CACGTG lautet. Desweiteren können auch nichtkanonische E-Boxen mit Abweichungen dieser Basenabfolge gebunden werden, welche die Sequenzen CACATG, CATGTG, CACGAG, CACGCG, CATGCG und CACGTTG beinhalten [44]. Die Bindung von MYC an DNA ist jedoch kontextspezifisch, d.h. nicht alle genomischen E-Box-Sequenzen werden gebunden. Die Bindung hängt von der umgebenden Chromatinstruktur ab. Einerseits ist eine Anreicherung von CpG-Inseln (siehe Abschnitt 1.2.2 auf Seite 11) bei hochaffinen Bindungsstellen festzustellen; andererseits haben Histonmodifikationen entscheidenden Einfluß auf die Bindung von MYC. Eine starke Korrelation der Bindung mit euchromatinmarkierenden Modifikationen, wie etwa der Trimethylierung von Lysin 4 an H3 (H3K4me3) und auch der Dimethylierung des-

selben Restes (H3K4me2) und von Lysin 79 (H3K79me2), wurde beobachtet. Desweiteren können diese sequenzunabhängigen Gegebenheiten eine Bindung von MYC an Nicht-E-Box-Sequenzen hervorrufen [45]. Auch die Bindung an chromatinassoziierte Proteine, z.B. MIZ-1 (siehe Abschnitt 1.4 auf Seite 21) kann die Rekrutierung von MYC fördern [27].

1.3.2 Regulation der Transkription durch c-MYC und MAX

Die Bindung des MYC-MAX-Heterodimers an eine DNA-Sequenz kann eine Aktivierung des entsprechenden Gens bewirken, indem Kofaktoren wie etwa die Histonacetyltransferasen (HATs) und HAT-Komplexe GCN5, PCAF, CBP, P300 oder TIP60 rekrutiert werden, welche durch Acetylierung von Lysinresten an Schwänzen der Kernhistone eine Auflockerung des Chromatins sowie Bindung weiterer Aktivatoren fördern. Der N-Terminus von MYC enthält drei hochkonservierte Regionen, die MYC-Boxen I bis III genannt werden. MYC-Box I scheint an der Regulation der Stabilität des Proteins beteiligt zu sein, ebenso MYC-Box III, letztere ist außerdem essentiell für die Funktion von MYC *in vivo* und für die volle Aktivierung und Repression einiger Zielgene. Myc-Box II ist für alle bekannten biologischen Funktionen von MYC notwendig und erforderlich für die Aktivierung und Repression vieler Zielgene. Für vier Proteine wurde gezeigt, daß sie direkt an MYC-Box II binden: TRRAP, eine Untereinheit vieler HAT-Komplexe (siehe Abschnitt 1.1.6 auf Seite 9), TIP48 und TIP49, hochkonservierte ATPasen und Untereinheiten vieler Chromatinumgestaltungskomplexe und auch des TIP60-Komplexes, sowie SKP2, eine Untereinheit des SCF-Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexes, welchen MYC für die Transaktivierung einiger Zielgene benötigt und welcher MYC ubiquitinieren kann [27].

Es gibt weitere Mechanismen für die Transaktivierung und wahrscheinlich auch für die Repression durch MYC, was dadurch gezeigt wird, daß die MYC-Box II nicht für die Aktivierung und Repression aller Zielgene notwendig ist. Beispielsweise binden die HATs P300 und CBP an den C-Terminus und der positive Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb) an den N-Terminus von MYC, und MYC kann unabhängig von MYC-Box II die DNA-Methyltransferase DNMT3a an den MYC-MIZ-1-Komplex (siehe Abschnitt 1.4.1 auf Seite 22) rekrutieren [27].

MAX kann ebenfalls mit den bHLH-LZ-Proteinen MAD1, MAD2, MAD3, MAD4 oder MNT dimerisieren und, wie alle bHLHL-LZ-Proteine, an E-Box-Sequenzen binden.

MAD-MAX– und MNT-MAX–Dimere sind Repressoren der Transkription. *In vivo* überwiegen MYC-MAX–Komplexe in proliferierenden und MAD-MAX– oder MNT-MAX–Komplexe in ruhenden oder differenzierten Zellen. Die Bindung an MAX ist für die transformierenden Eigenschaften von MYC und dessen Fähigkeit, Progression durch den Zellzyklus und Apoptose hervorzurufen, erforderlich [27].

1.3.3 Funktionen von c-MYC

MYC ist in der Lage, Zellen zu transformieren, kann andererseits aber auch Apoptose auslösen; dies ist abhängig vom zellulären Kontext. Weitere MYC zugeschriebene Funktionen sind Zellwachstum und -proliferation. Die Funktionen können den Effekten spezifischer Zellzyklus- und Stoffwechselwege zugeordnet werden. Es wurde bislang jedoch nicht geklärt, ob diese Wege stromabwärts von MYC oder *per se* für Proliferation und Transformation notwendig sind [27].

Transaktivierung und -repression durch MYC geschehen an einem definierten Schritt — MYC hat keinen Effekt auf den PIC-Aufbau, fördert aber die Promotor-Freigabe durch RNAPII an Promotoren aktivierter Zielgene und verhindert diese an Promotoren reprimierter Zielgene. MYC kann also im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription nach der Rekrutierung der RNAPII regulieren [27]. MYC reguliert eine Vielzahl von Genen, deren Produkte an verschiedenen zellulären Abläufen beteiligt sind. Beispiele sind die aktivierten Zielgene *NCL* (Nukleolin; Ribosombiogenese), *ODC* (Ornithindecaboxylase; Polyaminsynthese), *CCND2* und *E2F2* (Zyklusin D2 und Transkriptionsfaktor 2 des Adenovirus–E2-Promotors; Zellzyklusprogression) und *LDHA* (Laktatdehydrogenase; Glykolyse). Reprimiert werden beispielsweise die Zielgene *P21CIP1* und *P15INK4B* (CDK-interagierendes Protein 1 und Inhibitor von CDK4 B; Zellzyklusinhibitoren) sowie *C/EBP α* (CCAAT/Enhancer-bindendes Protein α , Zellzyklusinhibitor und Transkriptionsfaktor) [27, 46–48]. MYC ist zudem der einzige Faktor, für den beschrieben wurde, daß er die RNA-Polymerasen I, II und III regulieren kann [49].

1.3.4 MycER

MycER ist ein chimäres Fusionsprotein aus c-MYC und der Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors, welches von einer *in vitro* hergestellten cDNA-Sequenz exprimiert werden kann. Die Funktion von MycER ist abhängig von der Anwesenheit des Liganden, d.h. induzierbar [50]. Durch Einführung einer Mutation in der Ligandenbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors (Glycin 525 zu Arginin; G525R) durch *in vitro*-Mutagenese und Fusion der für die Hormonbindungsdomäne kodierenden cDNA-Sequenz mit dem 3'-Ende der c-MYC-cDNA (kodierend für AS 1–435) konnte die Spezifität der Ligandenbindung verändert werden, so daß statt Östrogen nun dessen semisynthetisches Analogon 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) gebunden wird, was den methodischen Einsatz des Fusionsproteins erleichtert [51]. Diese modifizierte, 4-OHT-induzierbare Form von MycER wird MycERTM, MycER^{TAM} oder MycER^{G525R} genannt und hat bei der praktischen Verwendung die ursprüngliche Version von MycER ersetzt; im folgenden ist bei Erwähnung von MycER die modifizierte, 4-OHT-induzierbare Version gemeint.

1.3.5 Die Interaktion von c-MYC mit dem Mediator-Komplex

Eine Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) mit gegen MED1 gerichteten Antikörpern in einem MYC-induzierbaren Zellsystem zeigte, daß der Mediator-Komplex abhängig von c-MYC an den murinen Zyklin D2-Promotor rekrutiert werden kann [52]. MED1 befindet sich im Mittelmodul des Mediator-Komplexes [34]. c-MYC kann *in vitro* und *in vivo* an den Mediator-Komplex binden, wie von Sandra Bernard gezeigt wurde. Die hierbei vornehmlich beteiligte Untereinheit ist MED24/TRAP100, welches Teil des Schwanzmoduls des Komplexes ist [53].

Med24 wurde in Mauszellen zusammen mit Med1/Trap220 als Koaktivator des Thyroidhormonrezeptors (TR) und des Vitamin D-Rezeptors (VDR) beschrieben [54, 55]. Eine genetische Deletion von *med24* in der Maus führte zum zusätzlichen Verlust der Mediator-Untereinheiten Med16 und Med23 aus dem Komplex sowie eine verringerte Bindung von Cdk8. Ansonsten scheint der Med24-defiziente Komplex keine weiteren strukturellen Defekte aufzuweisen und bindet an viele Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II. Seine Funktion bei der Aktivierung von Reporterkonstrukten ist jedoch stark beeinträchtigt. Desweiteren führt die Med24-Defizienz zum Tod der

Embryonen zwischen E8,5 und E10,5 [56]. Die Zerstörung des *med24*-Gens im Zebrafisch führt zu einem sehr speziellen Defekt bei der Entwicklung der Netzhaut [57], desweiteren ist das Protein beim Zebrafisch erforderlich für die Entwicklung des enterischen Nervensystems [58].

Eine Hemmung der Expression von *MED24* in U2OS-MycER-Zellen bewirkte eine verminderte Induktion der MYC-Zielgene *NCL* und *CCND2*, und eine Hemmung der Expression von *med24* in NIH3T3-MycER-Zellen bewirkte eine verminderte Induktion von *ncl*. Die Hemmung der Expression von *MED24* hatte jedoch keine Änderung der Verteilung der Zellpopulationen im Zellzyklus, keine Veränderung des Wachstumsverhaltens und keine Veränderung der Induktion von Apoptose in U2OS-MycER-Zellen zur Folge [59].

1.4 MIZ-1

Das MYC-interagierende Zinkfingerprotein 1 (MIZ-1) wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Versuch als Interaktionspartner von c-MYC gefunden. MIZ-1, schematisch dargestellt in Abb. 1.6, ist ein Transkriptionsfaktor, der über 13 Zinkfinger-Motive an DNA zu binden vermag. Desweiteren verfügt es über eine N-terminale BTB/POZ-Domäne, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann. MIZ-1 hat kein Kernlokalisierungssignal.



Abb. 1.6: Der Transkriptionsfaktor MIZ-1. Das 803 Aminosäurereste große Protein verfügt an seinem Aminoterminus über eine POZ-BTB-Domäne und desweiteren über dreizehn Zinkfinger-Motive.

MIZ-1 bindet über seine Zinkfinger-Motive spezifisch an Initiator (Inr)-Sequenzen (siehe Abschnitt 1.2.2 auf Seite 11) und hat eine aktivierende Wirkung auf die Transkription. Bestätigte Zielgene sind u.a. *P21CIP1* [60], *P15INK4B* [47], *P57KIP2*, *MAD4* und *C/EBP α* . Genetische Deletion von *miz1* in der Maus resultiert in einem früh embryonal letalen Phänotyp der homozygoten Tiere während der Gastrulation [48].

Im Zytoplasma kann MIZ-1 an Mikrotubuli binden [60, 61]. Dies geschieht über eine Region, die die Zinkfinger 7–11 umfaßt. Nach pharmakologisch herbeigeführter Depolymerisation der Mikrotubuli wird MIZ-1 abhängig von seiner POZ-Domäne, d.h. vermutlich durch Bindung an weitere Proteine, in den Zellkern importiert und kann dort u.a. das Zielgen *LDLR* aktivieren [61]. Viele Zielgene von MIZ-1 spielen eine Rolle im Zellzyklusarrest. MIZ-1 ist für den Zellzyklusarrest nach DNA-Schädigung durch UV-B-Bestrahlung erforderlich und führt diesen durch Aktivierung der Expression von *P21CIP1* herbei. [62].

1.4.1 Die Interaktion von c-MYC und MIZ-1

Das MYC-MAX-Dimer kann im Falle seiner durch Faktoren wie MIZ-1 verstärkten Bindung an DNA in einem ternären Komplex als Repressor fungieren. Mit MYC und MAX komplexiert kann MIZ-1 seinen Kofaktor P300 nicht mehr rekrutieren, dies führt zu einer Repression von *P15INK4B* [47]. *P21CIP1*, *P57KIP2*, *MAD4* und *C/EBP α* können ebenfalls durch den MYC-MIZ-1-Komplex reprimiert werden [48]. *P21CIP1* ist ein wichtiges reprimiertes Gen bei der Regulation der Zellproliferation in der G1-Phase durch MYC [62]. MYC rekrutiert die DNA-Methyltransferase DNMT3a an den ternären Komplex mit MIZ-1 an MIZ-1-Zielgenen, was zu einer Schließung des umgebenden Chromatins und so zu einer Repression der Transkription führt [27, 63]. Die Interaktion von c-MYC mit MIZ-1 ist notwendig für die Herbeiführung von Apoptose, jedoch nicht für die MYC-abhängige Transformation und Zellzyklusprogression [63]. Die Herbeiführung von Apoptose geschieht durch MYC-abhängige Repression des antiapoptotischen MIZ-1-Zielgens *BCL2* [64]. Der molekulare Mechanismus der MYC-vermittelten Repression von MIZ-1-Zielgenen ist jedoch bislang nicht geklärt.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

1.5.1 Identifizierung MIZ-1-assoziiierter Proteine

Es gibt Hinweise darauf, daß MIZ-1 im Zellkern in einem Komplex vorliegt, dessen Größe zwischen 500 kDa und 1 MDa beträgt [65]. MIZ-1- und c-MYC-assoziierte Prote-

ine sollten, einen von Jens-Peter Reese verfolgten Ansatz der Tandemaffinitäts(TAP)-Reinigung MIZ-1–assoziiierter Proteine ergänzend, durch Anreicherung des endogenen MIZ-1–Komplexes mittels Chromatographie und anschließenden Einsatz der multidimensionalen Proteinidentifikationstechnologie (MudPIT) [66], d.h. einen massenspektroskopischen Ansatz, identifiziert werden. Daraufhin sollte eine Validierung der putativen Interaktionen durch Koimmunpräzipitationsexperimente erfolgen.

1.5.2 Histonaustausch von H2A.Z durch c-MYC

c-MYC ist in der Lage, den TIP60-Komplex an Promotoren von Zielgenen zu rekrutieren. Kusch *et al.* konnten zeigen, daß der TIP60-Komplex in *Drosophila* die Histonvariante H2Av, welche Eigenschaften der in anderen Organismen vorkommenden Varianten H2A.X und H2A.Z vereint, mittels seiner Domino-ATPase–Untereinheit austauschen kann [12]. Domino ist ein Ortholog der humanen P400- und SRCAP-Proteine; der TIP60-Komplex enthält P400. H2A.X spielt eine Rolle bei der DNA-Schadensantwort, H2A.Z wurde u.a. mit der Regulation der Transkription in Verbindung gebracht.

Aufgrund dieser Hinweise soll in einem induzierbaren (MycER-)Zellsystem durch Chromatinimmunpräzipitationen (ChIPs) ein hypothetischer c-MYC–induzierter Austausch von H2A.Z und im weiteren durch funktionelle Expressionsanalysen (mit Einsatz von RNA-Interferenz (RNAi) zur Stilllegung der Expression von *H2A.Z* und putativer Austauschfaktoren) der zugrundeliegende Mechanismus überprüft bzw. aufgeklärt werden.

1.5.3 Charakterisierung der Interaktion von c-MYC mit dem Mediator-Komplex *via* MED24

Durch Expressionsanalysen in einem MYC-induzierbaren Zellsystem soll die funktionelle und biologische Relevanz der c-MYC–MED24–Interaktion geklärt und der diesbezügliche Mechanismus der Regulation der Transkription durch ChIP-Experimente untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und sonstige Materialien

2.1.1.1 Begasungsbrutschränke

BBD 6220, Heraeus, Hanau

2.1.1.2 Durchflußzytometer

FACScalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA

2.1.1.3 Elektroblot-Apparaturen

- Halbtrockenblot: Transblot SD, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
- Tankblot: Mini Blot, Harnischmacher Labortechnik, Kassel

2.1.1.4 Elektrophorese-Apparaturen

- Agarosegele: Werkstätten der Philipps-Universität, Marburg
- SDS-PAGE: Protean, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.1.5 HPLC-Anlage

Äkta Purifier 10/10, Fraktionssammler Frac-950; Amersham Biosciences, Piscataway, USA

2.1.1.6 Mikroskope

DMIRB, Leica Microsystems, Wetzlar

2.1.1.7 Netzteile für Elektrophorese und Elektroimmunoblot

Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.1.8 Objektträger und Deckgläser

Carl Roth, Karlsruhe

2.1.1.9 Photometer

- für Proteinkonzentrationsbestimmungen:
Ultraspec 2000, Pharmacia, Stockholm, Schweden
- für Nukleinsäurekonzentrationsbestimmungen:
ND-1000, NanoDrop, Wilmington, USA

2.1.1.10 Plastikröhrchen, Plastikplatten

- 0,5 ml: Sarstedt, Nümbrecht
- 1,5 ml: Eppendorf, Hamburg
- 1,8 ml Kryo-Röhrchen: Nunc, Roskilde, Dänemark
- 15 ml und 50 ml: "Falcon" BLUEMAX; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
- 96-Tüpfel-Platten, weiß: Thermo Scientific, Waltham, USA

- Poly-Prep-Röhrchen: Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.1.11 PVDF-Membran

Immobilon-P, Porengröße 0,45 µm; Millipore Corp., Bedford, USA

2.1.1.12 Röntgenfilme

- Super RX, Fujifilm, Tokio, Japan
- ECL Hyperfilm, Amersham Biosciences, Piscataway, USA

2.1.1.13 Schüttelinkubator

G25, New Brunswick Scientific Co., Edison, USA

2.1.1.14 Thermozykler und Heizblöcke

- Heizblock: HBT 130-2, HLC Biotech, Bovenden
- Heizblock, programmierbar: Thermomixer, Eppendorf, Hamburg
- Thermozykler für PCR und cDNA-Synthese: Mastercycler ep Gradient S, Eppendorf, Hamburg
- Thermozykler für qPCR: Mx3000p, Stratagene, Cedar Creek, USA

2.1.1.15 Ultraschall-Desintegrator

Sonifier S-250D; Branson Ultrasonics

2.1.1.16 Ultraviolett-Tisch

Mini-Transilluminator, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.1.17 Vakuumkonzentrator

DNA Speed Vac 110, Savant, Farmingdale, USA

2.1.1.18 Whatman-Filterpapier

Gel-Blotting Papier, Schleicher & Schuell

2.1.1.19 Zentrifugen

- Tischzentrifuge, ungekühlt: Picofuge, Heraeus, Hanau
- Tischzentrifuge, gekühlt: Picofuge fresco, Heraeus, Hanau
- Zentrifuge für Falcon-Röhrchen: Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau
- Zentrifuge für Maxipräparationsröhrchen: Sorvall, Beckman
- Ultrazentrifuge: TL-100, Beckman-Coulter, Fullerton, USA

2.1.2 Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien waren von analysenreiner Qualität und wurden von folgenden Herstellern bezogen:

- AppliChem, Gatersleben
- Carl Roth, Karlsruhe
- Sigma, St. Louis, USA
- Merck, Darmstadt

2.1.3 Puffer und andere Lösungen

Als Lösungsmittel wurden ddH₂O sowie –für DNA-Lösungen– Wasser für Injektionszwecke (Baxter, Lessines, Belgien oder Braun Medical, Sempach, Schweiz) verwen-

det, sofern nicht anders angegeben. Der pH-Wert wurde mit 37 % oder 2 M HCl bzw. 10 M oder 2 M NaOH eingestellt.

2.1.3.1 Anodenpuffer I

30 mM Tris; 0,01 % SDS (w/v); 10 % Methanol (v/v)

2.1.3.2 Anodenpuffer II

300 mM Tris; 0,01 % SDS (w/v); 10 % Methanol (v/v)

2.1.3.3 Bradford-Lösung

Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

2.1.3.4 ChIP-Lysepuffer I

5 mM PIPES pH 8,0; 85 mM KCl; 0,5 % (v/v) NP40; Lagerung bei 4 °C

2.1.3.5 ChIP-Lysepuffer II (RIPA-Puffer)

10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) NP40; 1 % (w/v) Natriumdeoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA; Lagerung bei 4 °C

2.1.3.6 ChIP-Waschpuffer I

20 mM Tris pH 8,1; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS; 2 mM EDTA; Lagerung bei 4 °C

2.1.3.7 ChIP-Waschpuffer II

20 mM Tris pH 8,1; 500 mM NaCl; 1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (w/v) SDS; 2 mM EDTA; Lagerung bei 4 °C

2.1.3.8 ChIP-Waschpuffer III

10 mM Tris pH 8,1; 250 mM LiCl; 1 % (v/v) NP40; 1 % (w/v) Natriumdeoxycholat; 1 mM EDTA; Lagerung bei 4 °C

2.1.3.9 ChIP-Elutionspuffer

0,1 M NaHCO₃; 1 % SDS; muß frisch vor Verwendung angesetzt werden

2.1.3.10 Chromatographie-Puffer (C-Puffer)

20 mM Tris pH 8,0; 1 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 10 % (v/v) Glycerin; 0–1000 mM NaCl

2.1.3.11 Dignam-Puffer A

10 mM HEPES-KOH pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 % (v/v) NP40; 50 mM NaF; 10 mM β -Glycerinphosphat; 10 mM Natriumpyrophosphat; 1 mM DTT; 1 mM Natriumorthovanadat; Sigma Proteaseinhibitorgemisch (1:1000); 1,5 mM PMSF

2.1.3.12 Dignam-Puffer B

20 mM HEPES-KOH pH 7,9; 400 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA; 15 % (v/v) Glycerin; 50 mM NaF; 10 mM β -Glycerinphosphat; 10 mM Natriumpyrophosphat; 1 mM DTT; 1 mM Natriumorthovanadat; Sigma Proteaseinhibitorgemisch (1:1000); 1,5 mM PMSF

2.1.3.13 Dignam-Puffer D

20 mM HEPES-KOH pH 7,9; 0,5 mM EDTA; 50 mM NaF; 10 mM β -Glyzerinphosphat; 10 mM Natriumpyrophosphat; 1 mM DTT; 1 mM Natriumorthovanadat; Sigma Proteaseinhibitorgemisch (1:1000); 1,5 mM PMSF

2.1.3.14 DNA-Ladepuffer (2×)

95 % Formamid (v/v); 20 mM EDTA; 0.025 % Bromphenolblau (w/v)

2.1.3.15 DNA-Ladepuffer (6×)

40 % (w/v) Saccharose; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 0,2 % (w/v) Xylenxanol; 10 mM EDTA; pH 8,0

2.1.3.16 DSG

Disuccinimidylglutarat, wasserfrei; Pierce Biotechnology, Rockford, USA

2.1.3.17 Ethidiumbromid

Stammlösung 10 mg/ml in H₂O; Carl Roth, Karlsruhe

2.1.3.18 Gelextraktionspuffer

500 mM CH₃COONH₄; 10 mM (CH₃COO)₂Mg·4H₂O

2.1.3.19 Glykogen

Glycogen for molecular biology, 20 mg/ml; Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.3.20 HBS (2×)

50 mM Hepes-KOH; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 7,05

2.1.3.21 Kathodenpuffer

30 mM Tris; 40 mM 6-Aminohexansäure; 0,01 % SDS (w/v); 10 % Methanol (v/v)

2.1.3.22 Laemmli-Ladepuffer (6×)

350 mM Tris-HCl pH 6,8; 10,28 % (w/v) SDS; 36 % (v/v) Glyzerin; 600 mM DTT; 0,012 % (w/v) Bromphenolblau

2.1.3.23 MMLV-RT-Puffer (5×)

250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂, hergestellt mit DEPC-behandeltem ddH₂O

2.1.3.24 NP40-Lysepuffer

50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) NP-40

2.1.3.25 PAGE-Laufpuffer

25 mM Tris/HCl pH 8,3; 200 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

2.1.3.26 PBS (10×)

1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄; pH 7,4; nach [67]

2.1.3.27 Polybren

Hexadimethrinbromid; 4 mg/ml in ddH₂O, Sigma, St. Louis, USA

2.1.3.28 Proteaseinhibitorgemisch

Protease-Inhibitor-Cocktail für Säugetierzell- und Gewebeextrakte; enthält 4-(2-Aminoethyl)benzylsulfonylfluorid, Pepstatin A, E-64, Bestatin, Leupeptin und Aprotinin, gelöst in DMSO; Sigma, St. Louis, USA

2.1.3.29 RNase-Inhibitor

RNasin, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.3.30 Tankblot-Puffer

25 mM Tris pH 8,0; 170 mM Glycin; 0,25 % SDS (w/v); 15 % Methanol (v/v)

2.1.3.31 TBS (10×)

500 mM Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,6

2.1.3.32 TBS-T

TBS mit 0,1 % Tween-20 (v/v)

2.1.3.33 TE

10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; pH 8,0

2.1.3.34 TNN-Lysepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 120 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % NP-40; 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 2 mM Na_3VO_4 ; 100 mM NaF

2.1.3.35 TRIzol/TRIfast zur RNA-Isolation

- TRIzol: Invitrogen, Carlsbad, USA
- TRIfast: Peqlab, Erlangen

2.1.4 Enzyme und Kits

2.1.4.1 Reverse Transkriptase

Superscript II, Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.4.2 Restriktionsendonukleasen

Sämtliche Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs und Fermentas bezogen und nach Herstellerangaben in den mitgelieferten Pufferlösungen verwendet.

2.1.4.3 Proteinase K

10 mg/ml; Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.4.4 RNase A

10mg/ml; Roche, Basel, Schweiz

2.1.4.5 T4 DNA-Ligase

Dieses Enzym wurde von den Firmen New England Biolabs und Fermentas bezogen und nach Herstellerangaben in der mitgelieferten Pufferlösung verwendet.

2.1.4.6 Kits für DNA-Reinigung

- Reinigung von PCR-Produkten: PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden
- Reinigung von DNA aus Gelfragmenten: Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden
- Reinigung von Plasmiden: JetStar, Genomed, Löhne

2.1.4.7 Kits für quantitative PCR

Kits für quantitative PCR wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Eurogentec, Köln
- Bioline, London, England
- Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.4.8 Kit für Silberfärbung

SilverQuest, Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper wurden von den Firmen Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; Abcam, Cambridge, England; Sigma, St. Louis, USA und Upstate, Lake Placid, USA bezogen oder wurden in der Arbeitsgruppe Eilers hergestellt. Der bislang nicht veröffentlichte Antikörper NE2 gegen einen N-terminalen

Antigen	Klonalität	Spezies	Hersteller	Bestellnr.
CDK2	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	sc-163
CDK8	polyklonal	Ziege	Santa Cruz	sc-1502
c-MYC (9E10)	monoklonal	Maus	Hybridom-Überstand [68]	—
c-MYC (N262)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	sc-764
ER α	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	sc-542
FLAG (M2)	monoklonal	Maus	Sigma	F3165
H2A.Z	polyklonal	Kaninchen	Abcam	ab4174
H2B	polyklonal	Kaninchen	Abcam	ab1790
H4ac	polyklonal	Kaninchen	Upstate	06-866
IRS4	polyklonal	Kaninchen	Upstate	06-771
MED1	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	sc-5334
MIZ-1 (10E2)	monoklonal	Maus	Labor Jiri Bartek	—
MIZ-1 (NE2)	polyklonal	Kaninchen	Labor Martin Eilers	—
MIZ-1 (H190)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	sc-22837
– (IgG-Fraktion)	polyklonal	Kaninchen	Sigma	I5006

Tab. 2.1: Primärantikörper.

Bereich von MIZ-1 wurde von Sandra Bernard hergestellt. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Es wurden HRP-gekoppelte α -Kaninchen– und α -Maus–Antikörper der Fa. Amersham Biosciences, Piscataway, USA verwendet.

2.1.6 Sonstige Proteine und Reagenzien

2.1.6.1 BMC-H1

Konditioniertes B-Zell–Medium; Roche, Basel, Schweiz

2.1.6.2 BSA

AppliChem, Gatersleben

2.1.6.3 DMEM

High Glucose, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA und High Glucose, Lonza Bioscience, Basel, Schweiz

2.1.6.4 FCS

Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*); Sigma, St. Louis, USA

2.1.6.5 Medien für die Chromatographie

- Phosphozellulose P11: Whatman, London, Großbritannien
- Superose 6 10/300 GL: Amersham Biosciences, Piscataway, USA
- MonoQ HR 5/5 und HR 10/10: Amersham Biosciences, Piscataway, USA
- MonoS HR 5/5: Amersham Biosciences, Piscataway, USA
- MiniQ 4.6/50 PE: Amersham Biosciences, Piscataway, USA
- MiniS 4.6/50 PE: Amersham Biosciences, Piscataway, USA

2.1.6.6 Molekulargewichtsmarker

Die verwendeten Proteinmolekulargewichtsmarker wurden von den Firmen Invitrogen, Carlsbad, USA (SeeBlue Plus 2) sowie Fermentas, Burlington, Kanada (PageRuler Prestained Protein Ladder) bezogen. Als DNA-Molekulargewichtsmarker wurde 1 kb DNA Ladder 1 µg/µl; GibcoBRL, Karlsruhe verwendet.

2.1.6.7 NCS

Serum neugeborener Kälber (*newborn calf serum*); Biochrom, Berlin

2.1.6.8 Protein A-Sepharose

Zymed, Wien, Österreich

2.1.6.9 Protein G-Sepharose

Suspension in 20 % (v/v) Ethanol in H₂O; Sigma, St. Louis, USA

2.1.7 Oligonukleotide und Plasmide

Sofern nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Oligonukleotide in lyophilisierter Form von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg), Metabion (Martinsried), Sigma (St. Louis, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA) und Operon (Köln) bezogen, mit einer Konzentration von 100 pmol/μl in ddH₂O gelöst und bei –20 °C gelagert.

2.1.7.1 Hexamer-Primer für die cDNA-Synthese

Roche, Basel, Schweiz

2.1.7.2 Oligonukleotide für qRT-PCR

Die verwendeten Sequenzen sind in den Tabellen 2.2 auf der nächsten Seite und 2.3 auf der nächsten Seite zusammengefaßt.

Transkript	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<i>CCND2</i>	ACAACCCTGACAGCATCACG	GAGAGGCCCTAGAGGTGCTAGACT
<i>NCL</i>	AGCAATCAGGCTGGAGTTGC	CAGTGGTATCCTCAGACAGGCC
<i>S14</i>	GGCAGACCGAGATGAATCCTC	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC
<i>GOLPH3</i>	GCTGACCCTGATGGAGGA	GTCATTCCAAAATGATGTGTAACC
<i>MED24</i>	CATTGCTGGACATCATGGAC	AGCGCAGCAGCCAGTGGA

Tab. 2.2: qRT-PCR–Primer für Transkripte von *H.sapiens*.

Transkript	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<i>ccnd2</i>	ATTTCAAGTGCCTGCAGAAG	ACACTTCTGTTCTCCTCACAGACCT
<i>eef1a1</i>	CGGCCACCTGATCTACAAAT	AAGGAGCCCTCTCCCATCT
<i>epfx1</i>	TACACATCCAGGCCACCAA	GGCCACAGGAGAGTCATT
<i>golp3</i>	GCTGACCCTGATGGAGGA	GTCATTCCAAAATGATGTGTAACC
<i>hs6st2</i>	CGCTAACTGGCACTCAAAGG	GCCATCTTTTTGGTGATGCT
<i>itm2a</i>	AAATCCTGACTGGCAAGGAG	AGTAAGCATGCATCTCCAGA
<i>ncl</i>	GAAAATGGCTCCTCCTCC	GTGGTAGCCTTTTTGCCTTTT
<i>npm1</i>	GCAGGGGCAAAAGATGAGT	CAAAGCCCCCTAGGGAAAC
<i>odc</i>	ATTCAGAGTTCTTGCTAAGTCG	TCATGGTTCTCGATGTGCTT
<i>p400</i>	AACAAGCGTCTGGCATCAC	CAGGAGCAGAACCTCCAGAC
<i>s16</i>	GATATTCGGGTCCGTGTG	TTGAGATGGACTGTCGGATG
<i>srcap</i>	TCTGGTTCTAAGGGCCACTG	AGATCAAACCGACCCATGTC

Tab. 2.3: qRT-PCR–Primer für Transkripte von *M.musculus*.

2.1.7.3 Oligonukleotide für ChIP-PCR

Die verwendeten Sequenzen wurden von Caroline Bouchard erstellt und sind in der Tabelle 2.4 aufgeführt.

Lokus	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<i>ccnd2</i> upstream-Region	CTTGGGCGCAGGACGGTTCC	CCTGGGCTCCTCGGACCCTATCAA
<i>ccnd2</i> E-Box 3	AAGAGAGGTGCAACCCACGCCATGCTA	CGTTTCTCACCTCCTTCCTGCTC
<i>ccnd2</i> E-Box 4	TTCTACTAGGCTTAAGAAGCACCCCTT	CCTCGCCAAACCAGGGATAAAGGTTAT
<i>ccnd2</i> E-Boxen 3 und 4	TTCTTAAGGAAGGAGGGACTCAGTGCC	GGAAAGGCTTATTTGAGAAAATTGCAA
<i>ccnd2</i> Transkriptionsstart	GAGCTGCTGTGCTGCGAGGTGG	AGGCCAGCGCAGGGGTAGTTCTC
<i>ccnd2</i> kodierende Region	ATGCCCCCATGGTATGCCTACAGA	CGAACTGCCCGGCTCTCCTCAG
β -Globin Promotor	AATGCGTTCGCCAAAAGGAT	AGAAGCAAATGTGAGGAGCAACTG

Tab. 2.4: ChIP-PCR–Primer für genomische Regionen von *M.musculus*.

2.1.7.4 Oligonukleotide für ChIP-qPCR

Die verwendeten Sequenzen sind in den Tabellen 2.5, 2.6 und 2.7 auf der nächsten Seite aufgeführt.

Lokus	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<i>CCND2</i> upstream	CCCCACGTGTGAGAGTCTG	TGAAGCTCGCCATCGAAT
<i>CCND2</i> E-Box 3	GAGGGAGGCACTCAGTCG	GCCCTGATGTGCTGGCCAA
<i>CCND2</i> E-Box 4	TCCTGTAAAGACAGCCTTGACTC	GCCCTGACACGTGCTCTAA
<i>CCND2</i> Transkriptionsstart	GGGAGAGGGAGGAGAGCTAA	CTCCCCCTTAAACTGGTCTCG
<i>CCND2</i> kod. Region	GACTTCATTGAGCACATCTTGC	TGCGGATCAGAGACAGCTT
<i>ELMO1</i> upstream (-2500)	TGGCAGACATGGTTTCAATC	CCATCTTTGGACCTGGTTGT
<i>NCL</i> E-Boxen (Intron 1)	ATCGGCCCTAGTCGGAGT	CGAAACACAGCGCAAAA
<i>DHFR</i> intergenische Region	TTGTTTCAGGGACAGGGTCTT	CTGTGGTGGGAAGATGGCT

Tab. 2.5: ChIP-qPCR–Primer für genomische Regionen von *H.sapiens*.

Lokus	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<i>apex1</i> E-Box	CCCCAGGTGTCTGACTCTTC	ACTCCAGACTCCCCTGATTGT
<i>cckbr</i> E-Box 1	AGCTACCCCATCACACCATC	TTCTGCCCACCTCTCATACC
<i>cckbr</i> E-Box 2	CGGTCCCTCATTTGTCTGGAT	AGACTGGCCAACAGCCCTTT
<i>ccnd2</i> upstream-Region	GCAACTTGAGTTTTTCAATGAGTTC	AATGTGTAATTGCAATGGAAGC
<i>ccnd2</i> E-Box 3	TTAAGGAAGGAGGAGTCACTG	TTAACTATATTAAGGAGGAGGAAGG
<i>ccnd2</i> E-Box 4	AGCACCCCTTTCTCCAACAT	CTGATAACTTTCAAGCTGTTGTCC
<i>ccnd2</i> Transkriptionsstart	CTGGCTATGGAGCTGCTGT	TCGATGGTCAACAGGTTCTG
<i>cip1</i> Transkriptionsstart	CGGTGAAGGAGTGGGTTG	TCGAGCTGCCTCCTTATAGC
<i>cks2</i> E-Box	ATCGGTAGGCAATTAGCACCT	TCGTCTGACTTCTTGCACAACT
<i>ddx18</i> E-Box	AGGCTCCAGCGGTACACTT	CATTCCGCTTCTCGATCTTC
<i>fasn</i> E-Box 1	TATCCACATCTGGCAATCCA	CTGAGGGCAGAGCAAACCTC
<i>fasn</i> E-Box 2	AACCGGGTGCAGGAGTCT	ATCTGCCTTCTCCAAGCTGA
<i>h2a.z</i> E-Box 1	GAGATCTGCGGACACGAAA	AGCTTCCCTCCCGGTCTA
<i>ldha</i> E-Boxen 2 und 3	GAGGAGCATGTCGGGTTG	AGTGGCTGCACGTGTGCT
<i>mcm7</i> E-Box 1	TACGCACGTGTGTGTATGC	GCCACTACAGTGAGCCAATG
<i>mina53</i> E-Boxen	CTCGGGACTTGGAGCGTA	TTTAGTCACTTGTTGGACATCCTG
<i>nap11</i> E-Box	AGGAGGGTATCAACCCCACTA	TTAAGCAGCAGGGAGATCAAG
<i>nbs1</i> E-Box	CACGTGTTAAGTGGTTGTCTCC	CCCCGAAACAAGATAGAGT
<i>ncl</i> E-Boxen (Intron 1)	CGGCGATCTGCTGTCTCT	CAACTGCTTCCCACCTTCTCTC
<i>npm1</i> E-Boxen 1, 2 und 3	CCGACTCTAGCCAACCTTCA	GCCACGGGCTATGAAATAAA
<i>odc</i> E-Boxen 1 und 2	AGGCAGCTGCTCCTGGAC	CTTGCCCTGGATCATCACC
<i>prep</i> E-Box	TACAACCAGGGAGTGCAGGT	GGAACTCACAAGCCATGACA
<i>psmb1</i> E-Box	TTGCTTTTCCAGTATGCTGCT	GCATTGGAACACCTTGAA
<i>shmt1</i> E-Boxen 1 und 2	GCGCTGGGGAGAGTTAGT	TGTCCTAACAGCCCAGCAC
<i>shmt1</i> E-Box 3	CCTGTCCCCATTACAGCCTA	CTTTGGGAAAACATACAGCA
<i>surf6</i> E-Box	CTGCTCAGCCAGGACACAC	TAAATGGGCTCCAGACCAAA
<i>tert</i> E-Box 1	CCCCTTTCGTTACTCCAACA	TTGATGGTCACAATGCTGGT
<i>tert</i> E-Box 2	TTTTTCGTGCTGGACTCTCAG	CGGGAACCAAGATGCAAG

Tab. 2.6: ChIP-qPCR–Primer für genomische Regionen von *M.musculus*.

Lokus	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<i>ccnd2</i> upstream-Region	CCCACAAGTCCCTTTACTTCA	TCACCTTCAAGGAGCTACAGTG
<i>ccnd2</i> E-Box 3	ACGCCATGCTATCTGCACT	CTCCCACCCTGCCTTTAACT
<i>ccnd2</i> E-Box 4	CCCTTTCCTCCAACATCCA	TGATAACTTTCAAGCTGTTTTTCG
<i>cip1</i> Initiator	CTGCTACAGTGCCCCGAGTTA	GTGTCTCGATATCGCTGTGG

Tab. 2.7: ChIP-qPCR–Primer für genomische Regionen von *R.norvegicus*.

2.1.7.5 Oligonukleotide für Klonierungen

Die nach *et al.* [69] für Klonierungen in den retroviralen Vektor pSUPER.retro.puro zur Expression von shRNA verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 2.8 aufgeführt. Die shRNA-Vektoren gegen *cdk8* und *med24* wurden von Dorothea Maaß hergestellt [59], der shRNA-Vektor gegen *MED24* stammt von Sandra Bernard [53].

Bezeichnung	Zieltranskript(e)	Sequenz
shcdk8-1	<i>cdk8</i>	ATATTTGCAGAACTACTAA
shcdk8-2	<i>cdk8</i>	GATGCCCCGAACATTCAACA
shmed24	<i>med24</i>	GAAGTCCCCTTCTTTGAGA
shmed24	<i>MED24</i>	CAGACACCGCGAAGACATT
shh2az-1	<i>h2a.z, H2A.Z</i>	CTTGCTATACGTGGAGATG
shh2az-uni	<i>h2a.z, H2A.Z</i>	TTGCTGGTGGTGGTGTCAT
shp400	<i>p400</i>	GGTAAAGAGTCCAGATTAA
shsrcap-uni	<i>srcap, SRCAP</i>	GCTCCCTCATCAACTCAA

Tab. 2.8: Verwendete shRNA-Sequenzen.

2.1.8 Vektoren

Die Karten der verwendeten Grundvektoren befinden sich im Anhang E auf Seite 127.

2.1.8.1 pCDNA3

Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus)-Promotor für transiente und stabile Transfektion. Vermittelte Resistenzen: Ampicillin, Neomycin. Hergestellt von Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.8.2 pCDNA3–MIZ-1

pCDNA3 mit *MIZ-1*–cDNA-Insert aus pUHD–MIZ-1

2.1.8.3 pCDNA3–c-MYC

pCDNA3 mit c-MYC–cDNA-Insert aus pBluescript KS-MYC

2.1.8.4 Mi2 β –FLAG

Modifizierter pCDNA3-Vektor (pCDNA3-FLAG) mit humaner Mi2 β /CHD4-cDNA [70] oder AG Bauer?

2.1.8.5 pSUPER.retro.puro

Von pMSCV (hergestellt aus dem Mausstammzellvirus) abgeleiteter retroviraler Vektor zur Erzeugung replikationsinkompetenter ecotroper Viren. Vermittelte Resistenzen: Ampicillin, Puromycin. Nach Brummelkamp *et al.* [69]

2.1.8.6 pSUPER.retro.blasti

Durch Ersetzen der Puromycin-Resistenzkassette von pSUPER.retro.puro durch eine Blasticidin-Resistenzkassette hergestellt; vermittelte Resistenzen: Ampicillin, Blasticidin. Labor Reuven Agami, NKI, Amsterdam, Niederlande

2.1.9 Zelllinien und Bakterienstämme

2.1.9.1 *E.coli* DH5 α

F ϕ 80dlacZ Δ (lacZYAegF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (r_K^i, m_K^+) *phoA supE44*
 λ -*thi-1 gyrA96 relA1*

2.1.9.2 HEK293T

Humane embryonale Nierzelllinie, transformiert mit SV40 large T; ATCC, Manassas, USA

2.1.9.3 ϕ NX-Eco

Packzelllinie für die Herstellung von ecotropen Retroviren [71].

2.1.9.4 NIH3T3

Aus embryonalem Mausgewebe angezüchtete Fibroblasten; ATCC, Manassas, USA.

2.1.9.5 NIH3T3 MycER hygro K1

Mit pBABEhygro-MycER infizierte NIH3T3-Zellen (Klon 1), hergestellt von Andreas Hock.

2.1.9.6 $p27^{-/-}$ 3T3 MycER puro K3

3T3-immortalisierte Mausfibroblasten mit genetischer Deletion von *p27kip2*, die mit pBABEpuro-MycER infiziert wurden (Klon 3) [72]

2.1.9.7 3T3 MycER puro

Nach dem 3T3-Protokoll immortalisierte und mit pBABEpuro-MycER infizierte Mausfibroblasten, hergestellt von Barbara Herkert

2.1.9.8 Rat1 MycER puro

Mit pBABEpuro-MycER infizierte Rat1-Fibroblasten, hergestellt von Martin Eilers

2.1.9.9 TGR-1

Rat1-Fibroblasten mit Wildtyp-*myc*-Allelen [73]

2.1.9.10 HO15.19B

TGR-1 Zellen mit genetischer Deletion von *c-myc* [73]

2.1.9.11 HO-MYC3

HO15.19B-Zellen mit rekonstituierter *c-myc*-Expression [73]

2.1.9.12 U2OS

Humane Osteosarkomzelllinie; ATCC, Manassas, USA

2.1.9.13 U2OS MycER hygro K9

Mit pBABEhygro-MycER infizierte U2OS-Zellen (Klon 9), hergestellt von Michael Wanzel

2.2 Methoden**2.2.1 Bioinformatische Methoden****2.2.1.1 Erstellung von Primer-Sequenzen**

Für die Erstellung von Primer-Sequenzen für Klonierungen wurde das Programm ApE v1.11 [74] genutzt.

Für die Erstellung von Primer-Sequenzen für qRT-PCR wurde das durch die Internetseite "Universal Probe Library" der Fa. Roche zur Verfügung gestellte Programm genutzt [75] (<http://www.universalprobelibrary.com>).

Für die Erstellung von ChIP-Primer-Sequenzen wurde das Programm Primer3 v0.4.0 [76] (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) genutzt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden zusätzlich durch Programme der Seiten VPCR 2.0 [77] (<http://grup.cribi.unipd.it/cgi-bin/mateo/vpcr2.cgi>) und In-Silico PCR der UCSC [78] (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?>) auf mögliche unspezifische Amplikons überprüft.

2.2.1.2 Sequenzanalyse und -vergleich

Zur Analyse von Sequenzierdaten wurde das Programm FinchTV 1.3.1 [79], für den Sequenzvergleich das Programm ClustalX 1.83.1 [80] und für das Auffinden ähnlicher Sequenzen die Programmsammlung BLAST [81,82] verwendet. Für das Auffinden von Sequenzmotiven und für die Planung von Klonierungsstrategien wurde das Programm ApE v1.11 [74] benutzt.

Die zugrundeliegenden cDNA-Sequenzen für sämtliche erstellten Primer-Sequenzen und Klonierungsstrategien stammten aus der "Nucleotide"-Datenbank des NCBI [83], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>. Die zugrundeliegenden genomischen DNA-Sequenzen für die Primer-Erstellung entstammten der Datenbank Ensembl [84], <http://www.ensembl.org>.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Auftauen von Zellen

Ein Aliquot (ca. 0,3 ml) eingefrorener Zellsuspension wurde durch Inkubation in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, sofort in einem Falcon-Röhrchen in einem Gesamtvolumen von 10 ml auf 37 °C vorgewärmtem DMEM (mit 10 % FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) aufgenommen und 5 min bei 1200 g zentrifu-

giert. Das Pellet wurde in 10 ml auf 37 °C vorgewärmtem DMEM (mit 10 % FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin — bei Hybridoma-Zellen zusätzlich 10 % BMC-H1) resuspendiert und die Suspension in einer 80 cm²-Zellkulturflasche bei 37 °C im Brutschrank unter 5 % CO₂ (v/v) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um Reste von DMSO zu entfernen.

2.2.2.2 Einfrieren von Zellen

Nach Kultivierung der Zellen bis zu einem subkonfluenten Zustand wurde das Medium abgesogen und der Zellrasen zweimal mit PBS-Lösung gewaschen. Die Ablösung erfolgte mit Trypsin/EDTA (0,25%ig (w/v)) bei RT, die Ablösung wurde mikroskopisch kontrolliert. Der Verdau wurde mit einem geeigneten Volumen auf 37 °C vorgewärmtem DMEM (mit 10 % FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 0,3 ml FCS mit 10 % DMSO (v/v) resuspendiert und in Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.3 Kultivierung von Zellen

Die Zelllinien wurden jeweils in den in Tab. 2.9 angegebenen Medien bei 37 °C im Brutschrank unter 5 % CO₂ (v/v) bis zur Konfluenz inkubiert. Die Kultivierung erfolgte in 10 oder 15 cm²-Zellkulturschalen (10 bzw. 20 ml Medium). Als Basis für sämtliche Medien wurde DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Das Hungern von Zellen erfolgte für drei Tage in den jeweils angegebenen Medien; beim Mediumwechsel wurde der Zellrasen nach Absaugen des Vollmediums jeweils zweimal mit PBS-Lösung gewaschen.

Bezeichnung	Medium	Hungermedium	Antibiotika
Rat1 MycER	10 % FCS (v/v)	0,1 % FCS (v/v)	2 µg/ml Puromycin
NIH3T3 MycER K1	10 % NCS (v/v)	0,75 % NCS (v/v)	200 µg/ml Hygromycin B
p27 ^{-/-} 3T3 MycER K3	10 % NCS (v/v)	0,1 % NCS (v/v)	2 µg/ml Puromycin
U2OS MycER K9	10 % FCS (v/v)	0,1 % FCS (v/v)	200 µg/ml Hygromycin B
φNX, HEK293T	10 % FCS (v/v)	—	—

Tab. 2.9: Kultur- und Hungermedien verschiedener Zelllinien und Klone.

2.2.2.4 Trypsinieren und Aussäen von Zellen

Die bis zur Konfluenz gewachsenen Zellen wurden zweimal mit je 20 ml auf 37 °C vorgewärmtem PBS gewaschen. Der Zellrasen wurde daraufhin für 1 min mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,25 %ig (w/v)) bei RT inkubiert, die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert und die Proteolyse mit 9 ml auf 37 °C vorgewärmtem DMEM (mit 10 % FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) gestoppt. Nach Resuspendierung erfolgte ein Aussäen in passender Verdünnung für nachfolgende Vorhaben (zur Kultivierung betrug die Verdünnung 1:3–1:10).

2.2.2.5 Herstellung von Hybridoma-Überständen

10E2-Hybridoma-Zellen wurden bis zu ihrem Tod in Kulturmedium belassen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 1000×g für 10 min bei 4 °C und nochmalige Zentrifugation bei 7000×g für 10 min bei 4 °C entfernt. Der Antikörper enthaltende Zellüberstand wurde für die Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und vor der Verwendung mit 0,05 % (w/v) Natriumazid versetzt, woraufhin er bei 4 °C gelagert werden konnte.

2.2.2.6 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen geschah durch die Kalziumphosphat-Methode oder mit Hilfe von Polyethylenimid (PEI).

Bei ersterer wurde die zu transfizierende DNA mit ddH₂O auf ein Volumen von 438 µl aufgefüllt und mit 62 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung versetzt. Hierzu wurden unter ständiger starker Durchmischung durch Einblasen von Luft mit einer Pasteurpipette tropfenweise 500 µl 2× HBS-Lösung gegeben. Die resultierende Lösung wurde sofort unter Schwenken in den Mediumüberstand der Zellen gegeben. Am Morgen des nächsten Tages wurde der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, und die Zellen wurden mit frischem Medium versorgt.

Für die Transfektion von Zellen mit PEI wurden die zu transfizierende DNA und 50 µl PEI-Stammlösung für 5 min mit je 500 µl PBS bei RT inkubiert. Nach Durchmischung der beiden Lösungen und Inkubation für 10 min bei RT wurde die Lösung sofort unter

Schwenken in den Mediumüberstand der Zellen gegeben. Am Morgen des nächsten Tages wurde der Mediumüberstand abgesaugt, und die Zellen wurden mit frischem Medium versorgt.

2.2.2.7 Retrovirale Infektion eukaryotischer Zellen

In eine 10 cm-Zellkulturschale wurden 5×10^6 ϕ NX-Eco-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 20–30 μ g Plasmid-DNA eines retroviralen Vektors (pSUPER.retro-Konstrukte) transfiziert. Nach ÜN-Inkubation wurde der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und mit 7 ml frischem Medium versehen. Nach 24 h konnte der erste Virusüberstand geerntet werden, nach weiteren 24 h Inkubation mit 7 ml frischem Medium wurde der zweite Virusüberstand geerntet. Die Überstände wurden entweder sofort zur Infektion eingesetzt oder in 3 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur stabilen Integration von Plasmid-DNA in das Genom eukaryotischer Zellen wurden diese im Verhältnis 1:5 in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag nach Absaugen des Mediums mit 3 ml viralem Überstand, 2 ml frischem Medium und 4 μ g/ml Polybren versetzt. Nach Inkubation ÜN wurde der Überstand entfernt und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Am zweiten Tag nach der Infektion wurden diese nach den Erfordernissen des nachfolgenden Experiments ausplattiert, und es wurde mit der Selektion begonnen (2 μ g/ml Puromycin oder 8 μ g/ml Blasticidin).

2.2.2.8 Aktivierung des MycER-Fusionsproteins durch 4-OHT

Für sämtliche Versuche mit Zellen, die das MycER-Fusionsprotein exprimieren, ist es wesentlich, daß in den Zellen wenige oder keine endogenen MYC-Proteine vorhanden sind, um im Experiment auftretende Effekte von Hintergrundsignalen unterscheiden zu können. Deswegen wurden die Zellen nach vorhergehender Beobachtung ihrer Wachstumseigenschaften in geeigneten Verdünnungen ausgesät, die sicherstellten, daß die miteinander zu vergleichenden Zellpopulationen zeitgleich das Stadium der Konfluenz erreichten. Daraufhin wurden die Zellen durch Serummangelbedingungen für drei Tage in einen Hungerzustand versetzt. Schließlich wurde das MycER-Fusionsprotein durch Versetzen des Überstandes der Kultur mit 200 nM 4-OHT ak-

tiviert; die Kontrollpopulationen wurden mit einem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (Ethanol) versehen.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Reinigung polyklonaler Antikörper aus Serum

300 µl Protein-G–Sephrose wurden mit 10 ml 100 mM Tris-Puffer (pH 8,0) für 10 min in einer Polyprep-Säule bei RT inkubiert. Die Sepharose wurde danach dreimal mit 10 ml 100 mM Tris-Puffer gewaschen, für 10 min mit 10 ml 10 mM Tris-Puffer inkubiert und dreimal mit demselben Puffer gewaschen. Daraufhin wurde die Sepharose für 90 min bei 4 °C unter Rotieren mit 1,2 ml Serum inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 10 ml 100 mM Tris-Puffer und einmaligem Waschen mit 10 ml 10 mM Tris-Puffer wurden gebundene Antikörper durch dreimaliges Hinzugeben von 200 µl 50 mM Glycin (pH 3,0) in je 20 µl 1 M Tris-Puffer pH 8,0 eluiert. Die Proteinkonzentrationen der Fraktionen wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Die Fraktionen wurden mit 0,05 % Natriumazid (w/v) versetzt und bei 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung von Zellysaten

Die Zellen wurden in einer runden Schale (Ø = 10 oder 15 cm) bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgesogen, die Schale auf Eis gestellt, der Zellrasen zweimal mit kalter PBS-Lösung gewaschen, mit einem Zellschraber abgelöst, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 50–200 µl mit Proteaseinhibitoren versetztem TNN-Puffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Zellysat durch Zentrifugation (10 min bei 13000 rpm und 4 °C) geklärt und das unlösliche Pellet verworfen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch (Bradford-Assay, siehe Abschnitt 2.2.3.6 auf Seite 50). Die Lysate wurden vor Verwendung für Elektroimmunoblots mit 1/5 Vol. Laemmli-Puffer (6×) versetzt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und bei –20 °C gelagert. Die durch das Versetzen mit Laemmli-Puffer entsprechend gesunkene Proteinkonzentration ist bei der weiteren Verwendung zu beachten.

2.2.3.3 Herstellung von Kernextrakten

Die Herstellung von Kernextrakten erfolgte ausgehend von in 15 cm-Schalen konfluent gewachsenen Zellen. Der Zellrasen wurde zweimal mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen, mit einem Zellschraber abgelöst, in ein geeignetes Gefäß überführt und für 5 min bei 4 °C und 1000×g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde pro eingesetzter Zellschale in 1 ml Dignam-Puffer A resuspendiert und für 15–20 min auf Eis inkubiert. Nach starkem Aufwirbeln mit einem Vortex-Mixer wurde die Suspension für 10 min bei 1500×g und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand ist das zytoplasmatische Lysat der Zellen. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellkerne in 200 µl Dignam-Puffer B pro eingesetzter Zellschale resuspendiert und für 20 min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneutem starken Aufwirbeln wurde die Suspension mit Dignam-Puffer D auf 150 mM NaCl eingestellt und bei 100000×g (50000 rpm in einem TLA-100.3–Rotor) und 4 °C für 30 min zentrifugiert; der Überstand ist der Kernextrakt. Verändert nach Dignam *et al.* [85].

2.2.3.4 Saure Extraktion basischer Proteine

Zur Extraktion basischer Proteine wie etwa Histone wurde folgendes Protokoll verwendet: Ein Pellet von auf einer 10 cm-Zellkulturschale gewachsenen Zellen wurde in 1 ml PBS mit 0,5 % Triton X-100 (v/v) und Proteaseinhibitorgemisch 1:1000 aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2000×g und 4 °C für 10 min wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 200 µl 0,2 N HCl aufgenommen und unter Schütteln bei 4 °C ÜN inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 2000×g und 4 °C für 10 min wurde der Überstand entfernt, sein Proteingehalt nach der Bradford-Methode (siehe Abschnitt 2.2.3.6 auf der nächsten Seite) bestimmt und der Extrakt bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

2.2.3.5 Herstellung von S100-Extrakten

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000×g und 4 °C pelletiert, mit 30 mM Tris-HCl-Puffer mit pH 7,4 und 150 mM NaCl gewaschen und erneut pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 2,5 Vol. 10 mM Tris-HCl mit pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch

20 Schläge mit einem Douncer aufgeschlossen. Daraufhin wurden durch Hinzufügen von 1/10 Vol. 300 mM Tris-HCl pH 7,9, 1,4 M KCl und 30 mM MgCl₂ isotonische Bedingungen wiederhergestellt. Nach einer Ultrazentrifugation für 90 min bei 100000×g wurde der Überstand ("S100") dekantiert, auf eine Konzentration von 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT und 0,2 mM PMSF eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C eingefroren.

2.2.3.6 Bradford-Assay

1 µl der zu vermessenden Proteinlösung wurde mit 1 ml Bradford-Lösung vermischt, für 5 min bei RT inkubiert und die Absorption bei $\lambda = 595$ nm photometrisch bestimmt. Mithilfe einer zuvor erstellten Eichgerade wurde die Proteinkonzentration näherungsweise bestimmt.

2.2.3.7 Immunpräzipitation

Nach Herstellung von Proteinlysaten wurden von diesen pro Probe für die Immunpräzipitation 1 mg verwendet. Zu den Proben wurde je 1 µg des entsprechenden Antikörpers gegeben, danach erfolgte eine Inkubation bei 4 °C ÜN im Überkopfschüttler. Am nächsten Tag wurden je 60 µl Protein A- oder Protein G-Suspension (50 % (v/v) in TNN-Lyspuffer) hinzugegeben und für 2 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach viermaligem Waschen, wobei jeweils eine Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm erfolgte, wurden gebundene Proteine durch Versetzen der Sepharose-Kügelchen mit 50–100 µl 2× Laemmli-Puffer (verdünnt mit TNN-Lysepuffer) und Inkubation für 5 min bei 95 °C eluiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden je 10 µl des Überstandes auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Aliquot geladen, welches einen definierten Anteil des eingesetzten Lysats darstellt (Input).

2.2.3.8 SDS-PAGE

Elektrophoretische Auftrennungen von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgten nach Laemmli *et al.* [86] und Ahn *et al.* [87].

2.2.3.9 Elektroimmunoblot

Elektroimmunoblots nach der Halbtrockenmethode wurden nach Sambrook und Russell durchgeführt [67]. Elektroimmunoblots nach dem Tank-Verfahren erfolgten nach folgender Vorschrift: Eine PVDF-Membran wurde für 1 min in Methanol inkubiert, zweimal in Wasser gewaschen und schließlich für 5 min in Tankblot-Puffer inkubiert. Der Transfer geschah in einer Harnischmacher-Blotkammer bei 250 mA und 4 °C ÜN.

Nach dem Transfer wurde die Membran in TBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für 1 h bei RT oder bei 4 °C ÜN unter Schütteln inkubiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 1–3 h bei RT oder ÜN bei 4 °C in frischer TBS-T-Lösung mit 5 % (w/v) Magermilchpulver unter Schütteln. Der Erstantikörper wurde in einer für diesen spezifischen Verdünnung eingesetzt (meist 1:1000, maximal 1:5000). Die Membran wurde daraufhin 3×10 min in TBS-T bei RT auf einem Schüttler gewaschen und für 30–90 min in frischer TBS-T-Lösung mit 5 % (w/v) Magermilchpulver mit dem Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*)-gekoppelten Zweitantikörper (1:3000–1:20000 verdünnt) bei RT geschüttelt. Nach erneutem Waschen (3×10 min in TBS-T bei RT auf einem Schüttler) erfolgte die Detektion von Signalen mittels Chemolumineszenz.

2.2.3.10 Chemolumineszenz

Die Entwicklung von Elektroimmunoblots mittels Chemolumineszenz erfolgte mit Hilfe von ECL Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) nach Herstellerangaben oder nach der Luminol-Methode. Bei letzterer wurde die mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper inkubierte und daraufhin gewaschene Membran für 1 min in 20 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,25 mM Luminol; 0,2 mM *para*-Cumarsäure; 0,009 % H₂O₂ (v/v) inkubiert. Die Lösung wurde entfernt, die Membran sofort zwischen zwei Stücken Whatman-Papier getrocknet und zur Exposition von Röntgenfilmen benutzt.

2.2.3.11 Kolonie-Assay

Von für die Färbung bereiten 10 cm-Zellkulturschalen wurde das Medium abgesogen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Nachdem die Zellkulturschalen getrocknet wa-

ren, wurden die Zellen für 10 min mit 70 % EtOH fixiert und dann für 15 min getrocknet. Jede Schale wurde mit 4 ml Kristallviolettlösung (0,1 % (v/v) in 20 % Ethanol) versetzt und für 30 min inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes und mehrmaligem Waschen mit ddH₂O wurden die Schalen getrocknet.

2.2.4 Chromatographie

Bei der chromatographischen Reinigung von Proteinen wurden Chromatographie-Puffer (C-Puffer) ohne NaCl und mit 1 M NaCl eingesetzt, welche durch Einstellung des Ansaugverhältnisses aus den beiden Flaschen zur gewünschten Molarität von NaCl gemischt wurden, d.h. 0 mM NaCl (abgekürzt C0) bis 1000 mM NaCl (abgekürzt C1000). Zur Erstellung von Elutionsprofilen wurde fortlaufend die Absorption der eluierten Lösung bei 280 nm, welche mit ihrem Proteingehalt korreliert, durch einen UV-Detektor des Äkta Purifier 10 gemessen. Die austretende Lösung wurde fraktioniert und die Fraktionen nach Entnahme von Aliquots für Proteingehaltsbestimmung und Blot-Analyse bei –80 °C gelagert. Für nachfolgende chromatographische Läufe wurden die Fraktionen auf Eis aufgetaut.

2.2.4.1 Phosphozellulose-Flüssigchromatographie

Mit Hilfe von Phosphozellulose wurden DNA-bindende Proteine aus S100-Extrakt gereinigt. Die Phosphozellulosematrix (Whatman P11) wurde vor Gebrauch durch Versetzen mit NaCl-haltigem Puffer in die Na⁺-gebundene Form überführt und anschließend mit 5–10 Säulenvolumina (SV) C100 äquilibriert. Der Auftrag des Zellextraktes erfolgte nach Dialyse gegen C100 auf die Säule mit 0,5 SV pro Stunde. Die Durchbruchfraktion (genannt PCA) wurde mit C100 gewaschen, bis die Nulllinie des UV-Detektors erreicht war. Die Elution weiterer Fraktionen erfolgte mit C350 (PCB), C600 (PCC) und schließlich C1000 (PCD).

2.2.4.2 Gelfiltration

Gelfiltration gestattet die Trennung von Proteinen und -komplexen nach Größe, wobei größere Proteine und -komplexe schneller eluieren als kleine. Die Superose 6-Säule

wurde vor Gebrauch mit 5–10 SV C175 äquilibriert. Die Probe wurde in einem geeignet kleinen Volumen aufgetragen und ohne Änderung der Durchflußgeschwindigkeit aufgetrennt. Nach Elution der Proteine wurde die Säule mit 2 SV C175 gewaschen.

2.2.4.3 Ionentauscher-Flüssigchromatographie

Die MonoQ-, MonoS-, MiniQ- oder MiniS-Säule wurde mit 4–6 SV C-Puffer mit 150 mM NaCl äquilibriert. Danach wurden maximal 10 mg Protein pro ml Säulenvolumen aufgetragen; Proteinfraktionen wurden ggf. mit C0 auf eine Salzkonzentration von 200 mM NaCl oder weniger verdünnt. Die Elution erfolgte je nach Erfordernis durch einen aufsteigenden Salzgradienten (C150 bis C600) oder durch mehrstufige plötzliche Steigerung der Salzkonzentration (Stufen-Elution). Schließlich wurden sämtliche noch an die Säule gebundenen Proteine mit C1000 eluiert, bis die Nulllinie des UV-Detektors erreicht war.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Plasmidpräparation

Plasmid-Maxipräparationen wurden mithilfe des Jetstar-Kits der Fa. Genomed, Löhne nach Herstellerangaben durchgeführt.

Plasmid-Minipräparationen fanden mit Nutzung derselben Puffer nach folgendem Protokoll statt: 1,8 ml Bakteriensuspension wurden für 5 min bei 13000 rpm und RT in einem Eppendorf-Röhrchen in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand des Pellets entfernt. Dieses wurde in 200 µl Puffer I aufgenommen, mit 200 µl Puffer II versetzt und zur Lyse der Bakterien für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 200 µl Puffer III hinzugefügt und der Inhalt des Röhrchens durch Invertieren schonend durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgetrennt und in einem neuen Röhrchen mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte für mindestens 15 min bei –20 °C. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und in 30 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.5.2 RNA-Isolation

Das Zellpellet (maximal aus einer konfluent bewachsenen 10 cm-Schale) wurde in einem Eppendorf-Röhrchen in 1 ml TRIzol- oder TRIfast-Lösung resuspendiert und für 5 min bei RT oder länger inkubiert, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar waren. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Probe für 15 s mit einem Vortex-Schüttler auf höchster Stufe durchmischt und für 2–3 min bei RT inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge wurden 500 µl der oberen, wässrigen Phase in ein neues Röhrchen überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt, durchmischt und für 30–120 min bei –20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm wurde der Überstand entfernt und das RNA-Pellet zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol (v/v), angesetzt mit DEPC-behandeltem ddH₂O, gewaschen. Nach gründlicher Entfernung des Überstands wurde das Pellet für 1–3 h bei RT an der Luft getrocknet, mit 20–50 µl DEPC-behandeltem ddH₂O versetzt und bis zum vollständigen Gefrieren bei –20 °C inkubiert. Nach Auftauen wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.5.3 cDNA-Synthese

2 µg RNA wurden in einem 0,5 ml-Röhrchen mit DEPC-behandeltem ddH₂O auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt, mit 2 µl Hexamer-Primer-Lösung versetzt und im Thermozykler für 1 min auf 65 °C erhitzt. Das Röhrchen wurde auf Eis gestellt und die Lösung mit einem Ansatz von

- 20,8 µl DEPC-behandeltem ddH₂O
- 10 µl MMLV-RT-Puffer (5×)
- 5 µl 0,1 M DTT (angesetzt mit DEPC-behandeltem ddH₂O)
- 1 µl dNTP-Lösung
- 0,2 µl RNAsin
- 1 µl reverser Transkriptase

versetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte durch 10-minütige Inkubation bei 21 °C, 50-minütige Inkubation bei 37 °C und 15-minütige Inkubation bei 70 °C im Thermozykler. Die cDNA-Lösung wurde bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

2.2.5.4 Klonierung

Die molekulare Klonierung erfolgte nach Sambrook und Russell [67]. Die Hybridisierung von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden und die Ligation in den retroviralen Vektor pSUPER.Retro.puro erfolgte nach Brummelkamp *et al.* [69]; die Oligonukleotide wurden ggf. vor der Ligation durch denaturierende Gelelektrophorese von Synthesezwischenprodukten getrennt. Das Umklonieren von DNA-Fragmenten, die den shRNA-kodierenden Bereich enthielten, erfolgte über Nutzung der Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pSUPER.Retro.blasti. Die Klonierungsstrategien für die weiteren im Rahmen dieser Arbeit erstellten Vektoren sind jeweils bei diesen aufgeführt.

2.2.5.5 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese von DNA geschah nach der Methode von Aaij und Borst [88]. Die Elektrophorese von RNA geschah analog hierzu, es wurde jedoch Laemmli-Ladepuffer verwendet.

2.2.5.6 Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Die Proben (je 10 µl) wurden vor der Beladung mit 10 µl 2× DNA-Ladepuffer versetzt und mit der Pipette gründlich gemischt. Es wurden Gele bestehend aus 12 % Acrylamid (w/v) und 8 M Harnstoff nach folgender Vorschrift hergestellt und eingesetzt (verändert nach [67, 89]):

1. 4 g Harnstoff in 3 ml Acryl-/Bisacrylamidlösung (40 % in H₂O); 1 ml 10× TBE-Puffer; ad 9,8 ml mit H₂O lösen, mit 200 µl APS-Lösung (10 % (w/v)) und 6,2 µl TEMED versetzen und sofort gießen, für 20 min polymerisieren lassen,
2. Für 20 min zum Zweck der Erwärmung auf ca. 60 °C einen Strom mit einer Leistung von maximal 6 W anlegen (z. B. $I = 20$ mA und $U = 300$ V), dann die Taschen spülen und mit den Proben (Gesamtvolumen je 20 µl) beladen,
3. Unter denselben Bedingungen eine Elektrophorese durchführen, bis die Farbstofffront den unteren Rand des Gels erreicht,

4. Färbung mit Ethidiumbromid

2.2.5.7 DNA-Extraktion aus Gelfragmenten nach der *crush and soak*-Methode

Es wurde nach folgender Vorschrift vorgegangen (verändert nach [67]):

1. Die Banden des gewünschten DNA-Fragments aus einem präparativen Gel ausschneiden,
2. Die Gelfragmente in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit 1 Vol. Gelextraktionspuffer versetzen und mit einer Pipettenspitze gründlich zerkleinern,
3. 2 × bei –20 °C einfrieren, auftauen und mit einer Pipettenspitze zerkleinern,
4. ÜN bei RT im Überkopfschüttler inkubieren,
5. 2 × 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren und jeweils die pelletierten Gelfragmente verwerfen.

2.2.5.8 Standard-PCR

Standard-PCR-Reaktionen wurden nach Sambrook und Russell [67] durchgeführt, hierbei wurden Polymerasen RedTaq (Sigma, St. Louis, USA) und PfuTurbo (Stratagene, Cedar Creek, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.5.9 Quantitative PCR

Die Kits für die quantitative PCR wurden nach Herstellerangaben unter Einsatz von 5 pmol jedes Primer-Oligonukleotids pro Reaktion durchgeführt, das Reaktionsvolumen betrug jedoch 25 (Eurogentec) bzw. 20 µl (Bioline, Thermo Scientific). Die anfängliche Denaturierung erfolgte nach Herstellerangaben. Das verwendete Temperaturprogramm bestand aus 40 Zyklen; 15 s 95 °C; 20 s 60 °C; 15 s 72 °C. Jede Messung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Ct-Werte wurden durch die MxPro-Software Version 3.20 der Fa. Stratagene (Cedar Creek, USA) ermittelt.

Zur Bestimmung der relativen Expression exp_{rel} eines Gens wurde dessen relative Transkriptmenge mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode und mit Nutzung der Messung der Expressi-

on des Transkriptes eines nicht durch das experimentelle System beeinflussten Haushaltsgens [90] (*S14*, welches in menschlichen Zellen für das ribosomale Protein S14 kodiert bzw. *s16*, welches in Nagetierzellen für das ribosomale Protein S16 kodiert) bestimmt. Die Bestimmung des Anteils präzipitierter DNA-Fragmente relativ zur eingesetzten Chromatinmenge bei ChIP-Experimenten erfolgte analog unter Bildung des ΔC_t -Wertes; der Anteil gebundener DNA bei einer 1 % der Gesamtchromatinmenge entsprechenden Input-DNA ist demnach

$$\text{Anteil}_{\text{Input}} [\%] = \frac{1}{2^{(C_t^{\text{Probe}} - C_t^{\text{Input}})}} \cdot$$

Der Fehler der Messung wurde nach der Methode des Gaußschen Fehlers und der entsprechenden Fehlerfortpflanzung unter Einbeziehung sämtlicher Standardabweichungen aller beteiligten Einzelmessungen berechnet und als Standardabweichung (SD, *standard deviation*) der Messung angegeben; die Formel hierfür lautet

$$SD = \exp_{\text{rel}} \ln(2) \sqrt{\text{fehler}_1^2 + \text{fehler}_2^2 + \text{fehler}_3^2 + \text{fehler}_4^2},$$

wobei zu beachten ist, daß bei Berechnung des Fehlers des als 1 definierten Bezugswertes lediglich zwei Standardabweichungen (fehler_1 und fehler_2) in den Term einfließen. Bei Berechnungen des Fehlers von $\text{Anteil}_{\text{Input}}$ -Werten ist dies genauso, allerdings wird mit $\text{Anteil}_{\text{Input}}$ statt \exp_{rel} multipliziert, und es fließen lediglich zwei Fehler (des Inputs und der Probe) in die Berechnung ein:

$$SD = \text{Anteil}_{\text{Input}} \ln(2) \sqrt{\text{fehler}_1^2 + \text{fehler}_2^2}.$$

2.2.5.10 Chromatinimmunpräzipitation

In 15 cm-Schalen ausgesäte, das MycER-Fusionsprotein exprimierende Zellen wurden entsprechend behandelt (Aktivierung von MycER durch Zugabe von 200 nM 4-OHT für 0–6 Stunden).

Um auch nicht direkt DNA-bindende Kofaktoren zu präzipitieren, geschah optional eine Behandlung der Zellen mit Disuccinimidylglutarat (DSG) als Reagens zur Protein-Protein-Kreuzvernetzung. Hierzu erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS bei RT eine Inkubation mit 2 mM DSG in PBS mit 1 mM MgCl_2 für 45 min bei RT. Die DSG-Lösung (0,5 M in DMSO) wurde direkt vor Gebrauch angesetzt, und nach Zugabe in die Zellkulturschale wurde diese sofort stark geschwenkt. Danach wurde der Zellrasen

dreimal mit PBS bei RT gewaschen und vor der Fixierung mit 20 ml PBS mit 1 mM MgCl_2 überschichtet.

Zur Kreuzvernetzung von Proteinen mit DNA wurden die Zellen mit Formaldehyd, dessen Endkonzentration 1 % betrug (zugesetzt zum Wachstumsmedium bzw. zur PBS-Lösung nach DSG-Behandlung) für 10 min bei RT fixiert. Die Lösung wurde durch Hinzugabe von 2,5 M Glycinlösung auf 125 mM Glycin eingestellt und für 5 min bei RT inkubiert, um verbliebenes Formaldehyd abreagieren zu lassen. Nach zweimaligem Waschen mit eiskalter PBS-Lösung wurden die Zellen durch Abschaben geerntet und in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen für 5 min bei 4 °C und 1200×g pelletiert. Die Zellpellets wurden entweder nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei –80 °C gelagert oder direkt in Lysepuffer aufgenommen.

Je ein Pellet aus 4–6 15 cm-Schalen wurde in 3 ml mit Proteaseinhibitorgemisch versetztem ChIP-Lysepuffer I resuspendiert, für 20 min auf Eis gelagert und dann für 5 min bei 4 °C und 1200×g pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 3 ml mit Proteaseinhibitorgemisch versetztem ChIP-Lysepuffer II (RIPA-Puffer) resuspendiert und für 10 min auf Eis gelagert. Zum Scheren des Chromatins wurde die Zellsuspension in 15 ml-Falcon-Röhrchen verteilt, so daß jedes 1 ml von ihr enthielt. Die Aliquots wurden mit dem Ultraschall-Desintegrator, dessen Mikrospritze bis zu etwa zwei Dritteln der möglichen Tiefe in die Suspension eingetaucht war, unter Kühlung durch ein 1:1 Eis-Ethanol-Gemisch folgendermaßen behandelt: 80×1 s bei 20 % Amplitude; jeweils 3 s Pause. Zur Kontrolle der Effizienz des Scherens, welches zu einer maximalen Fragmentgröße des Chromatins von 500–1000 bp führen soll, wurde ein 50 µl-Aliquot mit 2 µl RNase A- und 2 µl Proteinase K-Lösung (je 10 mg/ml) versetzt, mit 100 µl Mineralöl überschichtet, für 3 h bei 55 °C, dann ÜN bei 65 °C inkubiert, um die Kreuzvernetzung der Proteine untereinander und mit DNA wieder aufzuheben, und nach Versetzen mit DNA-Ladepuffer bei 80 V in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Wenn das Scheren erfolgreich war, d.h. wenn die Größe der Fragmente 1000 bp nicht überstieg — optimal ist eine maximale Größe von 500 bp — wurde die Suspension in mehrere Eppendorf-Röhrchen überführt, für 15 min bei 4 °C und 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der zusammengeführte Chromatin-Überstand für die Immunpräzipitation verwendet.

Entsprechend der verwendeten Antikörper wurden pro geplanter Probe 90 µl Protein A- oder Protein G-Sepharose in einem Gesamtansatz zweimal in 10 ml RIPA-Puffer

gewaschen, dann in 10 ml RIPA-Puffer resuspendiert und mit 1 mg/ml BSA, 400 µg/ml Lachssperma-DNA sowie 10 µl Proteaseinhibitorgemisch versetzt und ÜN bei 4 °C geschüttelt, um Bindungsstellen für DNA und Proteine der Sepharose zu blockieren. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1200×g wurden pro Probe 30 µl der blockierten Sepharose-Kügelchen entfernt und unter Schütteln bei 4 °C für 30–60 min mit der Chromatin-Lösung inkubiert. Zeitgleich wurden pro Probe 30 µl der blockierten Sepharose-Kügelchen in einem Gesamtansatz in 300–500 µl RIPA-Puffer mit 4 µg Kaninchen-IgG unter Schütteln bei 4 °C für 30–60 min inkubiert. Nach Abtrennung der Sepharose von der Chromatin-Lösung durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1200×g wurde letztere mit neuer Sepharose versetzt. An diese wurde parallel zur vorhergehenden Inkubation Kaninchen-IgG gekoppelt, und daraufhin wurde sie zweimal mit RIPA-Puffer gewaschen (Abtrennung durch Zentrifugation für 1 min bei 4 °C und 13000 rpm in einer Tischzentrifuge). Die Suspension wurde wiederum unter Schütteln bei 4 °C für 30–60 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1200×g war die nun von unspezifisch an Sepharose bindenden und von einer unspezifischen IgG-Fraktion gebundenen Molekülen bereinigte Chromatin-Lösung bereit für spezifische Immunpräzipitationen.

Pro Bindungsreaktion wurde ein einer 15 cm-Schale entsprechender Anteil der Lösung in einem Eppendorf-Röhrchen mit 4 µg Antikörper versetzt. Zuvor wurde der Chromatinpräparation ein Aliquot entnommen, das 1 % der pro Bindungsreaktion verwendeten Lösung entsprach (Input). Desweiteren wurde zur Spezifitätskontrolle der Antikörper eine Bindungsreaktion angesetzt, der 4 µg Kaninchen-IgG als Antikörper zugesetzt wurden. Alle Ansätze wurden unter Schütteln bei 4 °C ÜN inkubiert. Dann wurden pro Probe 30 µl blockierte Sepharose-Kügelchen hinzugegeben und die Röhrchen unter Schütteln bei 4 °C für 2 h inkubiert.

Die Kügelchen mit den nun gebundenen DNA-Fragmenten wurden für 1 min und bei 13000 rpm pelletiert und mit folgenden Pufferlösungen gewaschen: 2 × Waschpuffer I, 2 × Waschpuffer II, 4 × WaschpufferIII, 2 × TE. Hierbei wurden die Kügelchen nach dem Waschen mit Waschpuffer I jeweils in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Elution der gebundenen DNA-Fragmente erfolgte durch zweimalige, je 15-minütige Inkubation der Kügelchen mit je 250 µl ChIP-Elutionspuffer im Überkopfschüttler. Nach Vereinigung der beiden Überstände wurden diese mit 20 µl 5 M NaCl, 10 µl 500 mM EDTA, 20 µl 1 M Tris pH 6,5, 2 µl Proteinase K- (10 mg/ml)- und 1 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Die Input-Proben wurden mit Elutionspuffer auf ein Volumen von

500 µl aufgefüllt und ebenfalls mit den genannten Lösungen versetzt. Alle Proben wurden dann 3 h bei 55 °C, dann ÜN bei 65 °C inkubiert. Dann erfolgte eine Reinigung der DNA mit Hilfe des PCR Purification Kits. Der letzte Zentrifugationsschritt geschah nach einer Inkubation des Elutionspuffers (je 50 µl) in der Säulenmatrix für 5–10 min bei RT. Die Eluate wurden bis zur Analyse per Standard- oder quantitativer PCR bei –20 °C gelagert.

2.2.5.11 Durchflußzytometrie

NIH3T3 MycER K1-Zellen wurden mit Vektoren für die Expression von shscr oder shmed24 infiziert und selektiert. Pro Ansatz wurden 5×10^5 Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und zwei Tage lang in puromycinhaltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit puromycinhaltigem Hungermedium versetzt. Der Mediumüberstand je einer Schale wurde in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt, so daß die apoptotischen Zellen im Überstand nicht verloren gingen. Die Zellen wurden trypsiniert, im verwahrten Medium resuspendiert und wieder in das Röhrchen pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 4 °C und $400 \times g$. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Durch Hineintropfen der Suspension in 4 ml 100 % eiskaltes Ethanol, das in ein 15 ml Polystyrolröhrchen der Firma Sarstedt vorgelegt wurde, und Inkubation ÜN bei –20 °C erfolgte eine Fixierung der Zellen. Die weiteren Schalen wurden jeweils für 24 h mit 200 nM 4-OHT oder mit Ethanol behandelt und wie beschrieben geerntet und fixiert. Für die Propidiumjodidfärbung wurden die Zellen in 400 µl 38 mM Natriumcitrat, 15 µl einer 1 mg/ml Stammlösung Propidiumjodid und 1 µl RNase A von einer Stammlösung mit 10 mg/ml resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 min bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert und standen anschließend für die Messung zur Verfügung. Die Zellen wurden bis zur Messung auf Eis und abgeschirmt von Licht gelagert. Vor der Messung wurde die Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt, und 5×10^5 Zellen wurden analysiert. Für die Propidiumiodidmessung wurde der FL2-A-Detektor (linear) genutzt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Programms CellQuest Pro (Becton Dickinson), die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Modfit (Verity Software House).

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation MIZ-1–assoziierter Proteine

3.1.1 Reinigung des MIZ-1–Komplexes mittels Chromatographie

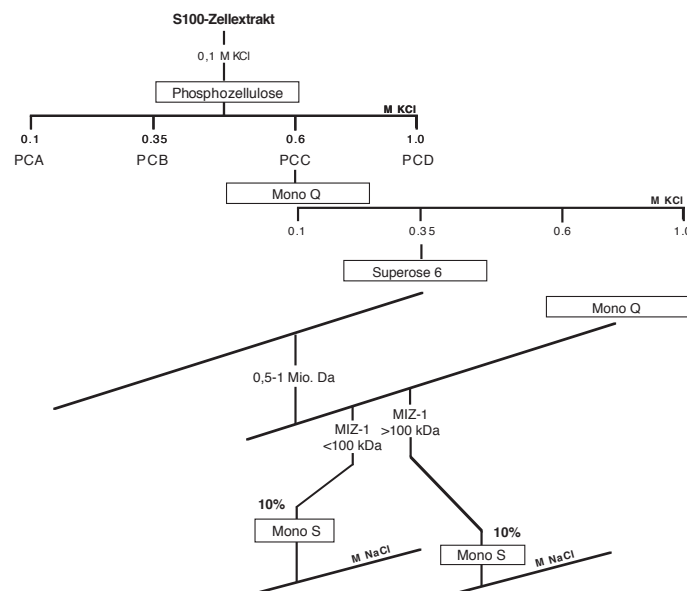


Abb. 3.1: Schema der Reinigungsstrategie für den MIZ-1–Komplex. Ein S100-Zellextrakt aus HEK293T-Zellen wurde auf eine Phosphozellulosesäule aufgetragen, und gebundene Proteine wurden mit stufenweise ansteigenden Salzkonzentrationen eluiert. Die C-Fraktion (Elution mit 600 mM KCl) wurde nachfolgend verdünnt und auf eine Mono Q-Anionentauschersäule aufgetragen und erneut mit stufenweise ansteigenden Salzkonzentrationen eluiert. Die 350 mM-Fraktion wurde über eine Gelfiltrationssäule weiter gereinigt. Proteinkomplexe von etwa 0,5–1 MDa Größe wurden an eine Mono Q-Anionentauschersäule gebunden und durch Salzgradientenelution wurden Fraktionen, die im Elektroimmunoblot MIZ-1–Banden unter 100 kDa und Fraktionen, die MIZ-1–Banden über 100 kDa zeigten, erhalten. Diese wurden getrennt voneinander über Mono S-Kationentauschersäulen (Gradientenelution) weiter gereinigt.

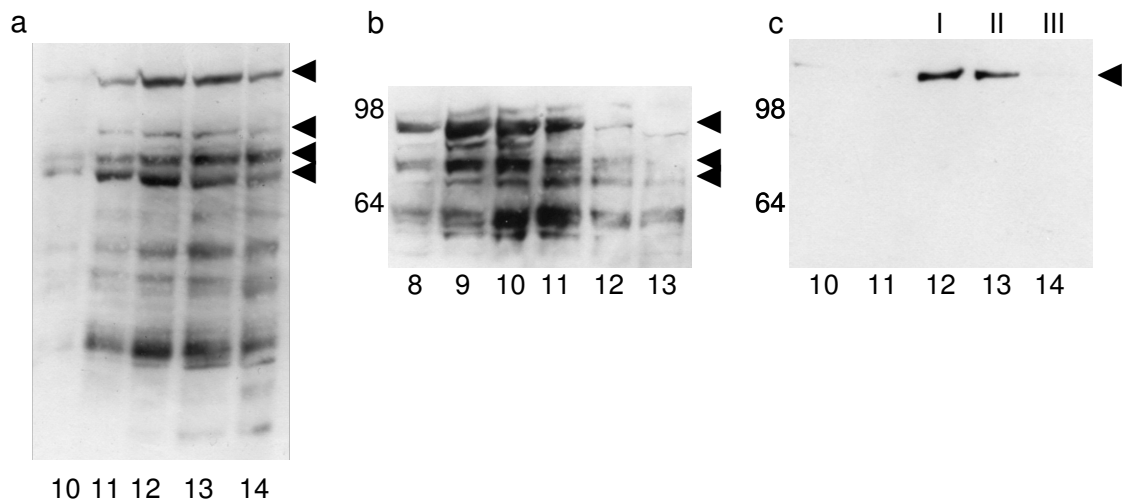


Abb. 3.2: Analyse von Fraktionen der MIZ-1–Reinigung. Elektroimmunoblots zeigen nach Färbung mit dem monoklonalen Antikörper 10E2 ein Muster von vier Banden, die MIZ-1 zuzuordnen sind (diese sind durch schwarze Pfeilspitzen hervorgehoben), sowie weitere niedermolekulare Banden. **(a)** Fraktionen nach Gelfiltration (Superose 6). **(b)** und **(c)** Fraktionen nach Bindung an Kationentauschersäulen (Mono S). Mit Hilfe dieser und der vorhergehenden Anionentauschersäule (Mono Q) konnte das mit einem höheren apparenten Molekulargewicht laufende, MIZ-1 zuzuordnende Polypeptid von den anderen Ketten getrennt werden. Die zusätzlich mit den Nummern I, II und III bezeichneten Fraktionen wurden für die MudPIT-Analyse verwendet.

Zur Reinigung des MIZ-1–Komplexes wurde eine klassische Strategie für DNA-bindende Proteine gewählt, die in Abb. 3.1 auf der vorherigen Seite dargestellt ist. Diese erbrachte stark mit MIZ-1 angereicherte Fraktionen, wie aus den Abbildungen 3.2 und 3.3 auf der nächsten Seite ersichtlich ist. Die Fraktionen, die in den Spuren 12–14 des Teils c der Abb. 3.2 bzw. in den Spuren 9–11 der Abb. 3.3 auf der nächsten Seite sichtbar sind, wurden durch Thomas Ruppert (ZMBH, Heidelberg) mit Hilfe der MudPIT-Methode analysiert. Im folgenden wurden diese mit den Nummern I, II und III bezeichnet, wobei in den Fraktionen I und II hochmolekulares MIZ-1 im Western-Blot eindeutig nachweisbar war (Spuren 9 und 10 der Abb. 3.2, Teil c). Die Ergebnisse der MudPIT-Analyse sind in den Tabellen C.1 auf Seite 113, C.2 auf Seite 114 und C.3 auf Seite 115 zusammengefaßt. Für die jeweiligen Treffer wurde eine Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der das angegebene Protein in der analysierten Lösung vorhanden ist. Diese betrug bei den hier gezeigten Listen mindestens 95 %.

Es wurden u.a. Peptide nachgewiesen, die den RNA-Polymerasen II und III, dem Spleißapparat und dem NuRD (*nucleosome remodeling and histone deacetylation*)-Komplex zugeordnet werden konnten. Desweiteren waren zahlreiche Translationsini-

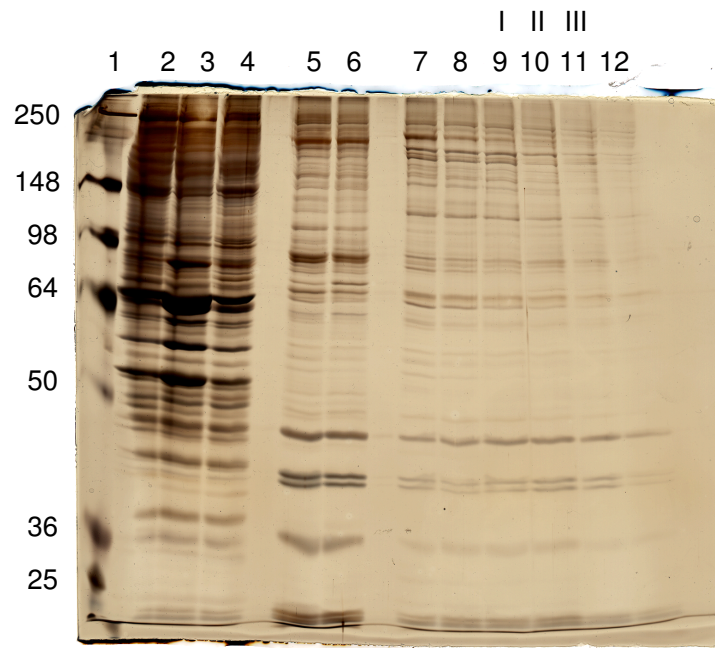


Abb. 3.3: Analyse von Fraktionen der MIZ-1–Reinigung (Silberfärbung nach SDS-PAGE). Aufgetragen wurden ein Marker in Spur 1 und Fraktionen der Kationentauschersäulen (Mono S) von niedermolekularem MIZ-1–Gehalt (Spuren 2–4) sowie von hochmolekularem MIZ-1–Gehalt (Spuren 5–12). Das jeweilige Molekulargewicht der Markerbanden ist angegeben. Die zusätzlich mit den Nummern I, II und III bezeichneten Fraktionen wurden für die MudPIT-Analyse verwendet.

tiationsfaktoren sowie Isoformen von Tubulin und Keratin in den Fraktionen enthalten. Um falsch positive Proteine, d.h. Verunreinigungen, von der weiteren Analyse auszuschließen, wurden die Listen mit Ergebnissen einer MIZ-1–TAP-tag–Reinigung (Jens-Peter Reese) [65], einer c-MYC–TAP-tag–Reinigung (Koch *et al.*) [91] und einem funktionellen Screen zur Identifizierung von Kofaktoren von MIZ-1 beim Zellzyklusarrest nach UV-B–Bestrahlung (Steffi Herold, persönliche Mitteilung) verglichen, um die Menge putativer Interaktoren von c-MYC und MIZ-1 einzugrenzen, die mit verschiedenen Ansätzen gefunden wurden. Dies sind zum einen Proteine des NuRD-Komplexes, welche von Koch *et al.*, Jens-Peter Reese und in dieser Studie nachgewiesen wurden (Chromodomänen–Helikase–DNA-bindendes Protein 4, CHD4; Retinoblastoma-bindendes Protein 4, RBBP4; Methyl-CpG-bindende Domäne–Protein3, MBD3), und zum anderen das Insulinrezeptorsubstrat 4 (IRS4), welches im Laufe der Anfertigung dieser Arbeit, von Koch *et al.* und von Steffi Herold gefunden wurde.

3.1.2 Überprüfung der Interaktionen mittels Koimmunpräzipitation

Die vermuteten Wechselwirkungen von c-MYC und MIZ-1 mit einigen der ermittelten Proteine wurden durch Koimmunpräzipitationen (KoIPs) überprüft. Dies geschah mit exogen exprimiertem FLAG-Mi2 β /CHD4 und mit endogen exprimiertem IRS4 jeweils in HEK293T-Zellen, welche IRS4 stark exprimieren.

3.1.2.1 Exogenes c-MYC interagiert mit exogenem Mi2 β /CHD4

Wie auch von Koch *et al.* gezeigt wurde [91], konnte eine Interaktion zwischen überexprimiertem FLAG-Mi2 β /CHD4 und überexprimiertem c-MYC nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4 auf der nächsten Seite). Bei Überexpression von c-MYC, MIZ-1 und FLAG-Mi2 β /CHD4 konnte c-MYC spezifisch durch eine α -FLAG-IP kopräzipitiert werden, jedoch nicht mit einem unspezifischen IgG-Gemisch aus Kaninchenserum. Wurde nur jeweils c-MYC, MIZ-1 oder FLAG-Mi2 β /CHD4 überexprimiert, gelang die Koimmunpräzipitation nicht. MIZ-1 konnte nach Überexpression von c-MYC, MIZ-1 und FLAG-Mi2 β /CHD4 und FLAG-IP nachgewiesen werden, jedoch führte auch eine Präzipitation mit einem unspezifischen IgG-Gemisch zu einem Signal, so daß keine spezifische Interaktion zwischen MIZ-1 und FLAG-Mi2 β /CHD4 gezeigt werden konnte.

3.1.2.2 Endogenes c-MYC interagiert mit endogenem IRS4

Eine IP mit einem polyklonalen Antikörper gegen IRS4 (siehe Abb. 3.5 auf Seite 66, rechte Spur) reicherte bei Färbung mit demselben Antikörper zwei der Signale an, die auch in der Input-Probe (linke Spur) sichtbar waren. Die Banden erschienen bei apparenten Molekulargewichten von 100 bzw. 170 kDa. Das Signal bei 170 kDa wurde besonders stark angereichert. IRS4 wurde als Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 160 kDa beschrieben [92, 93]. Bei einer IP mit einem polyklonalen Antikörper gegen c-MYC ließ sich mit dem Antikörper gegen IRS4 die Bande bei ca. 170 kDa anfärben, nicht jedoch die Bande bei 100 kDa. Desweiteren wurde eine Bande mit einer Laufweite zwischen 100 und 130 kDa sichtbar, die in der Input-Spur nicht sichtbar war. Die Immunpräzipitation in umgekehrter Richtung, d.h. mit einem Antikörper gegen IRS4, erbrachte kein spezifisches Signal für c-MYC. Wurde zur Kontrolle der Spezifität als präzipitierende Antikörper ein Gemisch von IgG-Molekülen aus Ka-

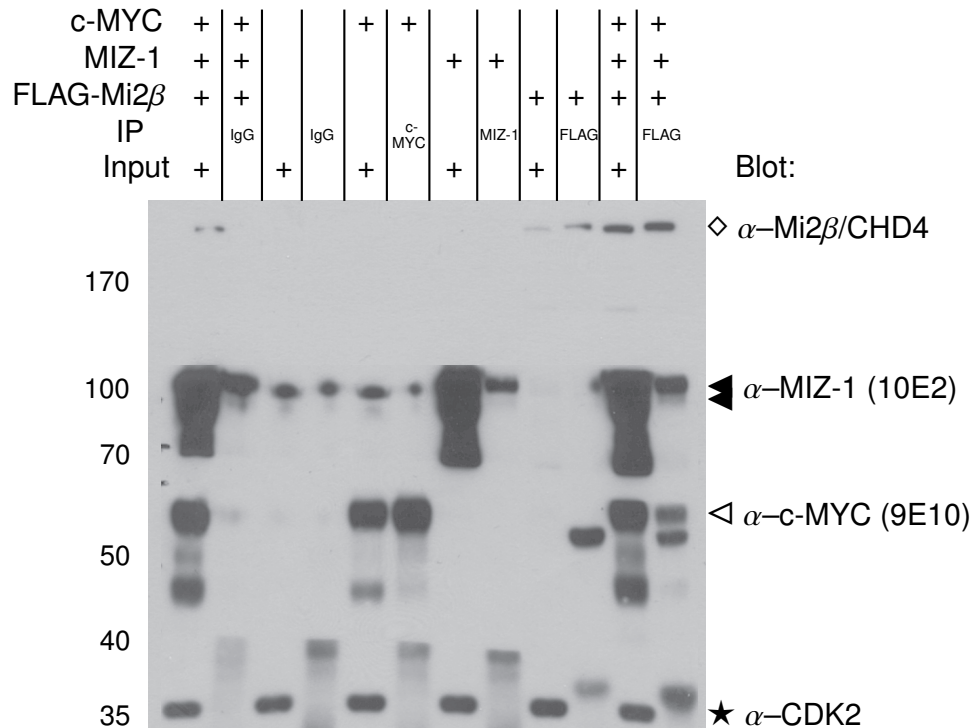


Abb. 3.4: Exogen exprimiertes c-MYC interagiert mit exogen exprimiertem FLAG-Mi2 β /CHD4. Die angezeigten cDNA-Sequenzen wurden in HEK293T-Zellen nach transienter Transfektion überexprimiert. Die Gesamtmenge transfizierter DNA betrug 6 μ g, die cDNA enthaltender Konstrukte betrug jeweils 2 μ g. Nach Lyse der Zellen wurden die Lysate in Aliquots mit je 600 μ g Proteingehalt mit je 1 μ g des angezeigten Antikörpers (N262 α -c-MYC; NE2 α -MIZ-1; M2 α -FLAG) versetzt, nach Immunpräzipitation Aliquots der Lysate und der präzipitierten Proteine in einem Elektroimmunoblot eingesetzt und Teile der Membran mit den angezeigten Antikörpern angefärbt. Die spezifischen Banden wurden mit einem Quadrat (Mi2 β /CHD4), mit ausgefüllten Pfeilspitzen (MIZ-1), mit einer Pfeilspitze (c-MYC) bzw. mit einem Stern (Cdk2) markiert. Die Laufweiten der Banden des Molekulargewichtsmarkers sind mit ihrem Gewicht in kDa angezeigt.

ninchenserum eingesetzt, war beim Elektroimmunoblot mit einem gegen IRS4 gerichteten Antikörper im Gegensatz zur den spezifischen IPs keine Bande bei 170 kDa sichtbar. Eine IP mit einem polyklonalen Antikörper gegen MIZ-1 zeigte ebenfalls keine Bande bei 170 kDa, d.h. zwischen MIZ-1 und IRS4 konnte unter den gewählten Bedingungen keine Interaktion gezeigt werden.

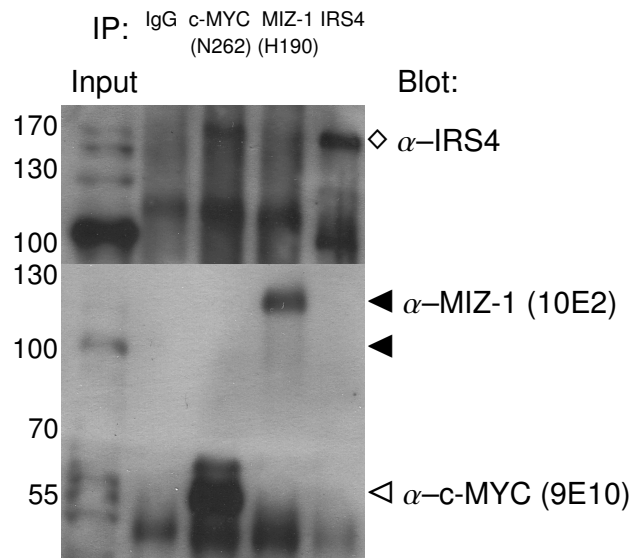


Abb. 3.5: c-MYC interagiert in embryonalen Nierenzellen mit IRS4. Nach Lyse von HEK293T-Zellen wurden die Lysate in Aliquots mit je 1 mg Proteingehalt mit je 1 µg des angezeigten Antikörpers versetzt, nach Immunpräzipitation Aliquots der Lysate (5 %, bezeichnet als Input) und der präzipitierten Proteine (50 %) in einem Elektroimmunoblot eingesetzt und Teile der Membran mit den angezeigten Antikörpern angefärbt. Die spezifischen Banden wurden mit einem Quadrat (IRS4), mit ausgefüllten Pfeilspitzen (MIZ-1) bzw. mit einer Pfeilspitze (c-MYC) markiert. Die Laufweiten der Banden eines Molekulargewichtsmarkers sind angezeigt.

3.2 c-MYC–vermittelter Austausch von H2A.Z

3.2.1 Promotor-Bindungsstudien

Es wurde zunächst ein ChIP-Experiment in p27^{-/-}3T3 MycER K3-Zellen durchgeführt, um die Hypothese zu überprüfen, daß MYC einen Austausch von H2A.Z hervorruufen kann. In diesen Zellen findet eine starke MycER-Bindung an den *ccnd2*-Promotor nach Zugabe von 4-OHT statt [94]. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von H2A.Z an die E3-Region von *ccnd2*, welche eine durch c-Myc gebundene E-Box enthält, durch OHT-Zugabe abnimmt (siehe Abb. 3.6 auf der nächsten Seite), d.h. während der Aktivierung des Promotors wird H2A.Z aus dem Nukleosom an der Position E3 entfernt. Ein Primerpaar für die Amplifikation einer Region, die beide von MycER gebundenen E-Boxen (E3 und E4) umfaßt, zeigt dasselbe Ergebnis; die Amplifikation eines Bereichs um die E-Box 4 (E4) erbrachte keine Signale für die untersuchten Faktoren. An anderen Bereichen des Promotors und in weiteren Regionen des Mausge-

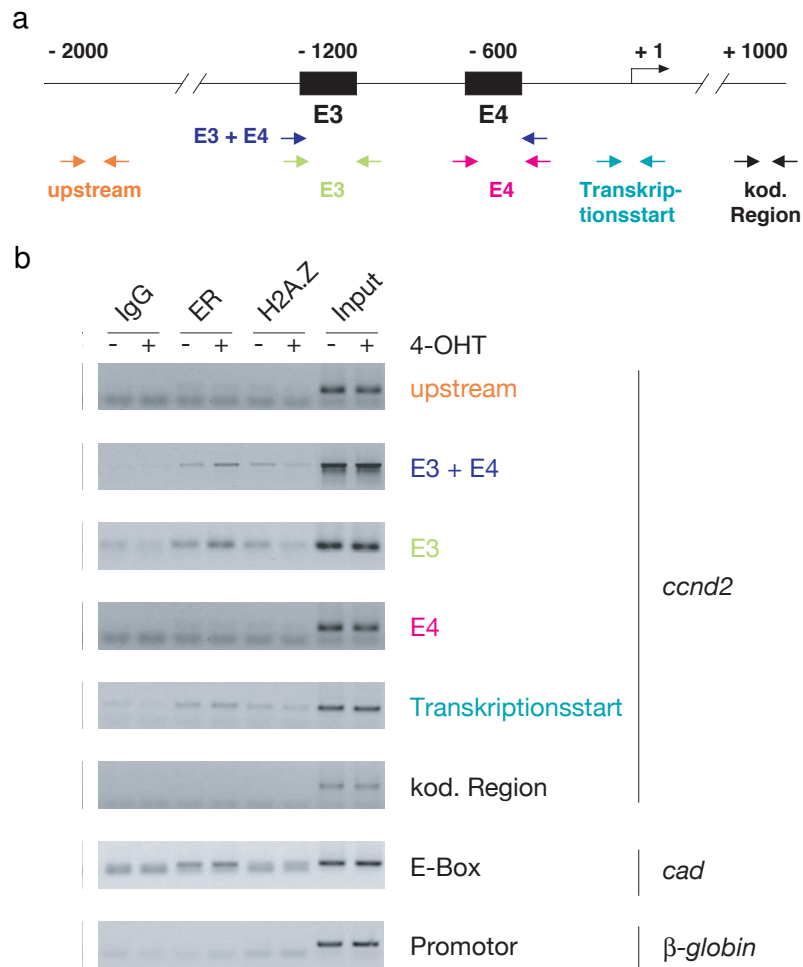


Abb. 3.6: Austausch von H2A.Z durch MycER in Mausfibroblasten. **(a)** Schematische Darstellung des *ccnd2*-Promotors und der Bindungsstellen der verwendeten Primer. **(b)** ChIP in p27^{-/-} 3T3 MycER K3-Zellen. Aliquots von Chromatinpräparationen von für 6 h mit Ethanol (-) bzw. 200 nM 4-OHT (+) behandelten Zellen wurden Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antikörpern unterzogen und die präzipitierte DNA mit den angezeigten Primer-Paaren in einer PCR amplifiziert. Ebenfalls amplifiziert wurde DNA aus 10 % der eingesetzten Chromatin-Aliquots (Input-DNA).

noms (E-Box des Myc-Zielgens *cad* und Promotor-Region von *β-Globin*) konnte keine Besetzung mit H2A.Z gezeigt werden.

Der Austausch von H2A.Z durch MycER konnte ebenfalls in MycER-exprimierenden Rattenfibroblasten gezeigt werden, wie im Teil a der Abb. 3.7 auf der nächsten Seite dargestellt ist. Hier nimmt die Besetzung mit H2A.Z in einer *upstream*-Region des *ccnd2*-Promotors nach Zugabe von 4-OHT ab, während die MycER-Bindung dort zunimmt; bei Amplifikation der E3-Region zeigt sich ein schwächeres Signal, welches

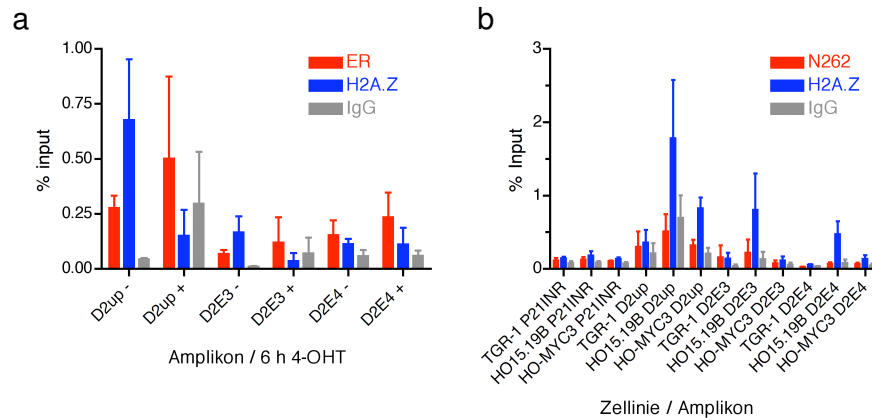


Abb. 3.7: Austausch von H2A.Z durch Myc und MycER in Rattenfibroblasten. **(a)** Das MycER-Fusionsprotein exprimierende Rat1-Zellen wurden mit 200 nM 4-OHT (+) oder mit Ethanol (-) behandelt, und es wurde ein ChIP-Experiment mit Antikörpern gegen den Östrogenrezeptor (ER) und H2A.Z sowie mit unspezifischen Antikörpern (IgG) durchgeführt. Die Bindung der Faktoren wurde in den upstream-, E3- und E4-Bereichen des *ccnd2*-Promotors bestimmt. **(b)** Wildtyp (wt)-Rattenfibroblasten (Zelllinie TGR-1), Rattenfibroblasten mit genetischer Deletion von *c-myc* (HO15.19B) und Zellen mit rekonstituierter *c-myc*-Expression (HO-MYC3) [73] wurden für ein ChIP-Experiment mit Antikörpern gegen c-Myc (N262) und H2A.Z sowie mit unspezifischen Antikörpern (IgG) verwendet. Die Bindung der Faktoren in den einzelnen Zelllinien wurde in der Initiator-Region des *p21cip1*-Promotors sowie in den upstream-, E3- und E4-Bereichen des *ccnd2*-Promotors bestimmt.

ebenfalls OHT-vermittelt abnimmt. Im Teil b derselben Abbildung ist dargestellt, daß auch endogenes Myc den Austausch von H2A.Z in Rattenfibroblasten hervorrufen kann. Hierzu wurden Wildtyp (wt)-Rattenfibroblasten (Zelllinie TGR-1), Rattenfibroblasten mit genetischer Deletion von *c-myc* (HO15.19B) und Zellen mit rekonstituierter *c-myc*-Expression (HO-MYC3) verwendet [73]. Auch hier zeigte sich bei Anwesenheit von Myc, d.h. in den wt- und *c-myc*-rekonstituierten Zellen, eine verminderte Besetzung der *upstream*-Region sowie der E3- und E4-Regionen mit H2A.Z im Vergleich zu Zellen mit *c-myc*-Deletion. Eine Amplifikation der Inr-Region des *p21cip1*-Promotors erbrachte keine zwischen den untersuchten Zelllinien unterschiedlichen Signale.

Der Austausch von H2A.Z durch MycER in 3T3-immortalisierten Mausfibroblasten konnte in manchen Experimenten nicht beobachtet werden. Dies war abhängig vom Hungerzustand der Zellen, d.h. möglicherweise von der Wirkung von endogenem c-Myc. Waren die Zellen durch fortwährenden Serummangel vollständig in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert, war zu den gewählten Zeitpunkten (0 h bzw. 6 h Stimulation mit 4-OHT) kein Austausch, d.h. keine Änderung der Besetzung mit H2A.Z in der

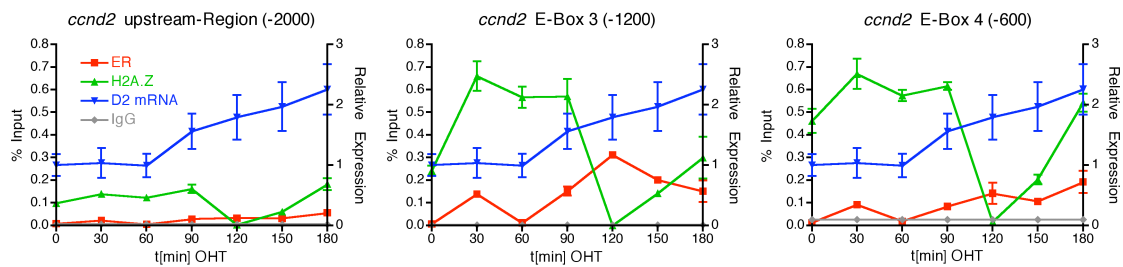


Abb. 3.8: Kinetik des H2A.Z-Austausches und der *ccnd2*-Expression durch MycER in Mausfibroblasten. Nach Behandlung von p27^{-/-}3T3 MycER K3-Zellen mit 200 nM 4-OHT wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen geerntet und ein ChIP-Experiment mit Antikörpern gegen den Östrogenrezeptor (ER) und H2A.Z sowie mit unspezifischen Antikörpern (IgG) durchgeführt und die Bindung dieser Faktoren in den upstream-, E3- und E4-Bereichen des *ccnd2*-Promotors bestimmt (linke Ordinate). Desweiteren wurde von nicht fixierten Aliquots der Zellen nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese die *ccnd2*-Expression relativ zum Haushaltsgen *s16* gemessen (rechte Ordinate). Der zeitliche Verlauf der Bindung von MycER und H2A.Z sowie der Expression von *ccnd2* wurden in den oben angegebenen Farben aufgetragen.

E3-Region des *ccnd2*-Promotors nachweisbar. Ein Zeitverlaufsexperiment zeigte, daß in vollständig arretierten Zellen nach 4-OHT-Zugabe H2A.Z zunächst rekrutiert und kurz darauf wieder aus der E3- und auch aus der E4-Region, welche eine weitere E-Box enthält, entfernt wurde, wie in Abb. 3.8 dargestellt ist. Desweiteren konnte in diesem Experiment beobachtet werden, daß die *ccnd2*-Expression mit dem MycER-vermittelten Austausch von H2A.Z korreliert. Während der Entfernung von H2A.Z aus dem Promotor von *ccnd2* stieg das mRNA-Expressionsniveau an; kurz nach der Rekrutierung von H2A.Z an den Promotor war noch kein Anstieg der Expression zu verzeichnen.

Für verschiedene c-Myc-Zielgene wurden Primer-Sequenzen erstellt, die die Amplifikation von genomischen DNA-Bereichen der Maus ermöglichen, an denen eine c-Myc-Bindung vermutet wurde (E-Box-Sequenzen in CpG-Inseln). Die isolierten DNA-Fragmente aus ChIP-Experimenten wurden auf einen H2A.Z-Austausch hin untersucht. Die Abbildungen 3.9 auf der nächsten Seite bzw. 3.10 auf Seite 71 zeigen, daß eine Abnahme der Besetzung der untersuchten Region mit H2A.Z oder ein Austausch desselben an den Promotoren der Gene *h2a.z*, *ncl*, *apex1*, *shmt1*, *mina53* und *nbs1* stattfindet. Die Änderung der Bindung von H2A.Z korrelierte mit der Bindung von MycER an den untersuchten Bereich des jeweiligen Promotors. Diese Beobachtungen

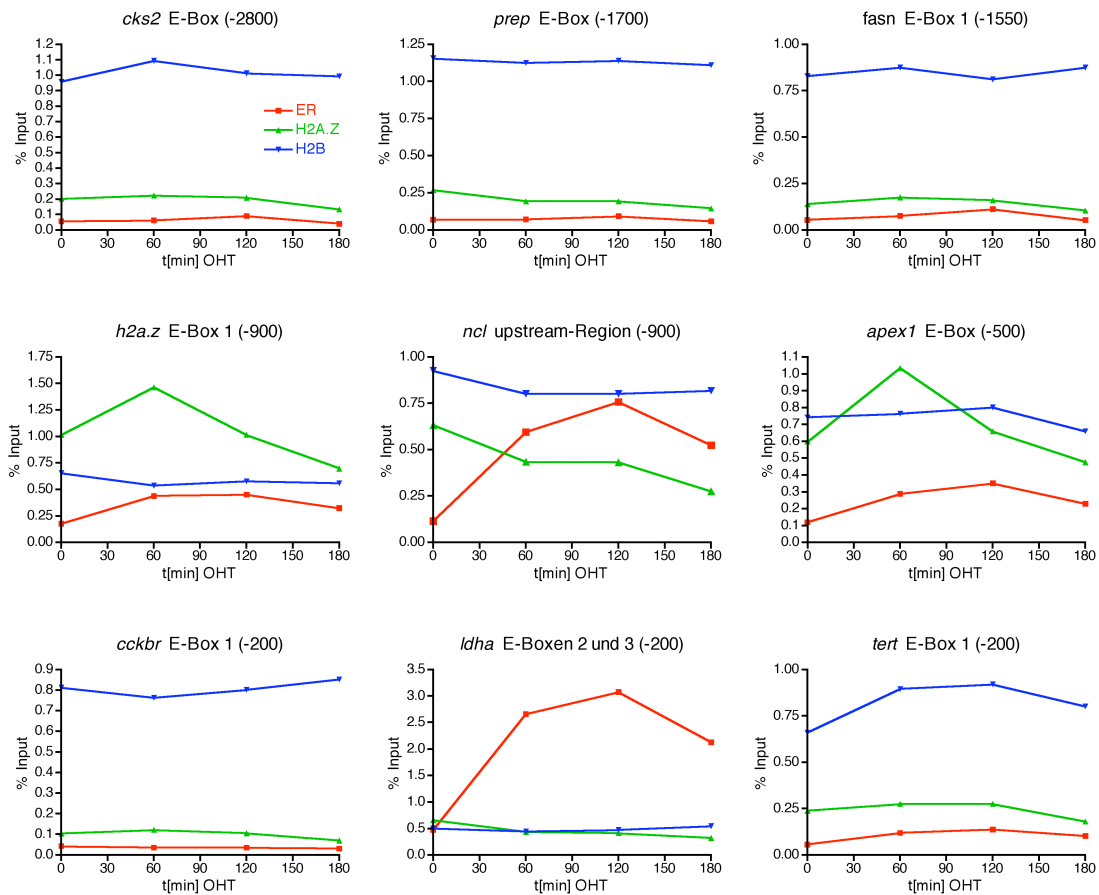


Abb. 3.9: Analyse des H2A.Z-Austauschs an verschiedenen Myc-Zielgenen in Mausfibroblasten (Teil 1). Nach Behandlung von p27^{-/-}3T3 MycER K3-Zellen mit 200 nM 4-OHT wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen geerntet und ein ChIP-Experiment mit Antikörpern gegen den Östrogenrezeptor (ER), H2A.Z und H2B durchgeführt und die Bindung dieser Faktoren an verschiedenen Bereichen von Myc-Zielgenen bestimmt. Die Position des Amplikons relativ zur Transkriptionsstartstelle ist jeweils angegeben.

und Beobachtungen aus weiteren ChIP-Experimenten sind in Tab. 3.1 auf Seite 72 zusammengefaßt. Die Ergebnisse zeigen eine Beschränkung der Bindung und des Austauschs von H2A.Z auf Bereiche von ca. -1500 bis +1250bp um die Transkriptionsstartstelle, was mit der Bindung von MYC korreliert.

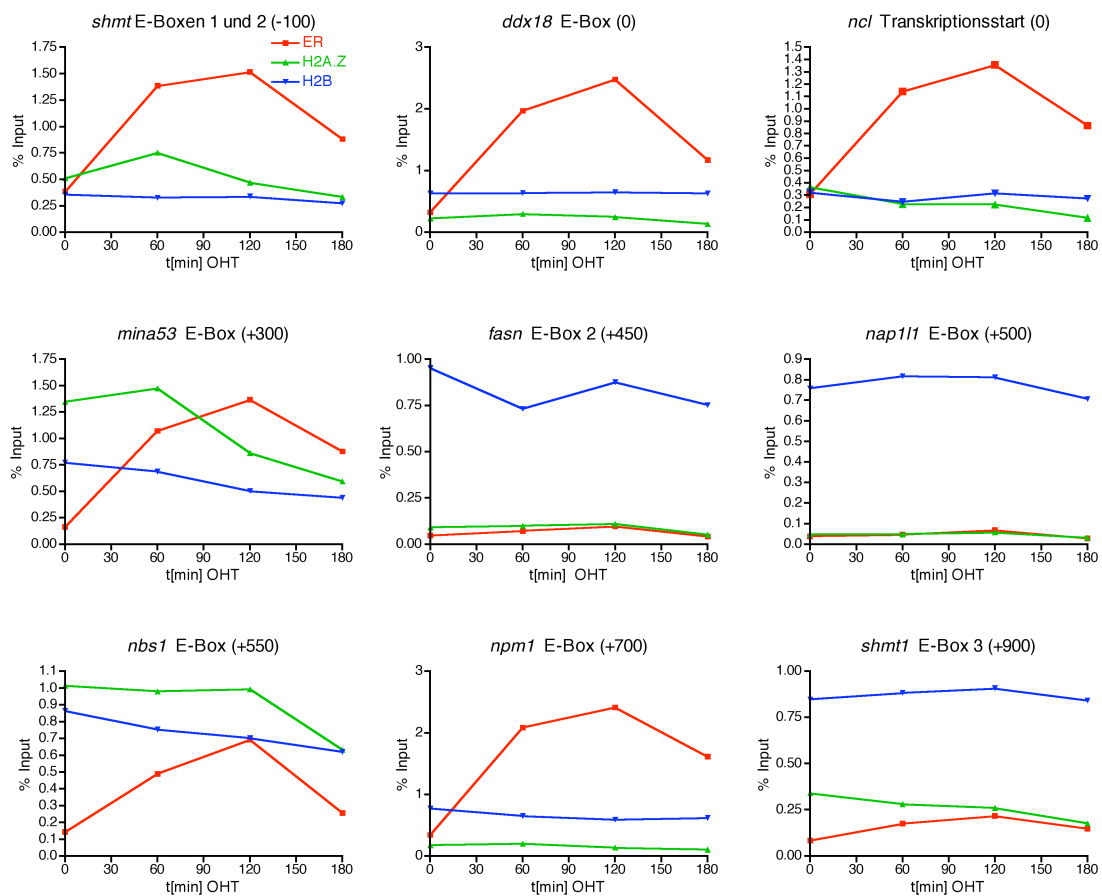


Abb. 3.10: Analyse des H2A.Z-Austauschs an verschiedenen Myc-Zielgenen in Mäusfibroblasten (Teil 2). Nach Behandlung von p27^{-/-}3T3 MycER K3-Zellen mit 200 nM 4-OHT wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen geerntet und ein ChIP-Experiment mit Antikörpern gegen den Östrogenrezeptor (ER), H2A.Z und H2B durchgeführt und die Bindung dieser Faktoren an verschiedenen Bereichen von Myc-Zielgenen bestimmt. Die Position des Amplikons relativ zur Transkriptionsstartstelle ist jeweils angegeben.

3.2.2 Expressionsanalysen

Es sollte die Auswirkung des Funktionsverlusts von H2A.Z und seiner putativen Austauschfaktoren bestimmt werden. Hierzu wurde shRNA-vermittelte Hemmung der Expression von murinem *h2a.z*, *p400* und *srcap* sowie humanem *H2A.Z* und *SRCAP* etabliert, es wurde die Abnahme der RNA-Menge oder im Fall von H2A.Z die Abnahme der Proteinmenge bestimmt. Die Effektivität der gegen H2A.Z gerichteten shRNA-Sequenzen ist in Abb. 3.11 auf Seite 73 dargestellt. Auf die Menge der RNA von H2A.Z

Gen	MycER-Bindung	H2A.Z-Austausch	Position
<i>cks2</i>	–	–	–2800
<i>ccnd2</i>	–	–	–2000
<i>prep</i>	–	–	–1700
<i>fasn</i>	+	+	–1550
<i>mcm7</i>	–	–	–1250
<i>ccnd2</i>	+	+	–1200
<i>h2a.z</i>	+	++	–900
<i>ncl</i>	+	+	–900
<i>ccnd2</i>	+	+	–600
<i>apex1</i>	+	++	–500
<i>cckbr</i>	–	–	–200
<i>ldha</i>	++	++	–200
<i>tert</i>	+	+	–200
<i>shmt1</i>	++	+	–100
<i>ccnd2</i>	–	–	0
<i>ddx18</i>	++	–	0
<i>ncl</i>	+	+	0
<i>cip1</i>	–	+	0
<i>tert</i>	+	+	0
<i>mina53</i>	++	++	+300
<i>odc</i>	+	++	+300
<i>fasn</i>	–	–	+450
<i>nap1l1</i>	–	–	+500
<i>nbs1</i>	+	+	+550
<i>npm1</i>	++	–	+700
<i>shmt1</i>	+	+	+900
<i>psmb1</i>	+	+	+1250
<i>surf6</i>	–	–	+1400
<i>cckbr</i>	–	–	+3300

Tab. 3.1: Ort des H2A.Z-Austauschs durch MycER relativ zum Transkriptionsstart. Durch ein Minuszeichen wird keine erkennbare Bindung bzw. kein erkennbarer Austausch, durch ein Pluszeichen eine erkennbare Bindung (>0,1 % des Input-Signals) bzw. ein erkennbarer Austausch (Änderung der Signalstärke um mehr als 10 %) und durch zwei Pluszeichen eine starke Bindung (>1 % des Input-Signals) bzw. ein starker Austausch (Änderung der Signalstärke um mehr als 50 %) gekennzeichnet.

haben die verwendeten Sequenzen keine oder nur schwach erkennbare Effekte; aufgrund der langen Halbwertszeit von Histonen ist hier eine Analyse der Proteinmenge sinnvoll.

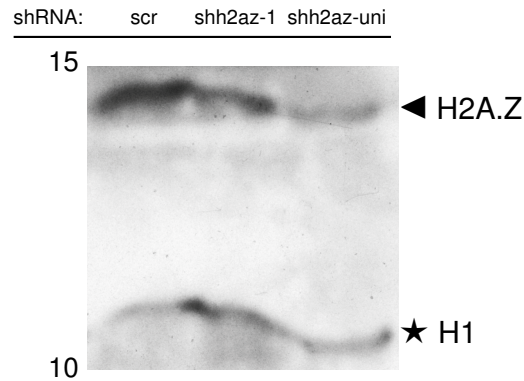


Abb. 3.11: shRNA-vermittelte Depletion von H2A.Z in U2OS-Zellen. U2OS MycER K9-Zellen wurden mit einer unspezifischen (shscr) oder gegen das Transkript von *H2A.Z* gerichteten shRNA-Sequenzen (shh2az-1 und shh2az-uni) exprimierenden retroviralen Vektoren infiziert und für 6 d mit Puromycin behandelt. Es erfolgte nach saurer Extraktion basischer Proteine ein Elektrophoretogramm mit einem Antikörper gegen H2A.Z, der eine Kreuzreaktivität mit Histon H1 zeigt. Die von H2A.Z hervorgerufenen Banden sind mit Pfeilspitzen, die von H1 hervorgerufenen Banden mit einem Stern markiert. Die Position der Banden des Molekulargewichtsmarkers wurden mit ihrem apparenten Gewicht in kDa angezeigt.

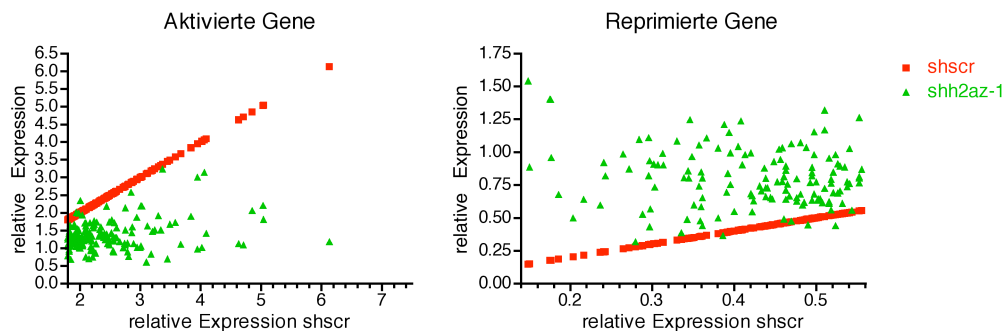


Abb. 3.12: Genomweite Auswirkung gehemmter Expression von *H2A.Z* auf MYC-Zielgene in humanen Osteosarkomzellen. U2OS MycER K9-Zellen wurden mit einer unspezifischen (shscr) oder einer gegen das Transkript von *H2A.Z* gerichteten shRNA-Sequenz (shh2az-1) exprimierenden retroviralen Vektoren infiziert, und nach Puromycin-Selektion erfolgte unter Serum-mangelbedingungen eine Aktivierung des MycER-Fusionsprotein durch Zugabe von 200 nM 4-OHT bzw. keine Aktivierung durch Zugabe des Lösungsmittels (Ethanol). Die Gesamt-RNA der Zellen wurde in mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte cRNA umgeschrieben und auf einem Objektträger an cDNA-Sequenzen, welche 20000 Gene der Maus repräsentieren, hybridisiert (Microarray-Gruppe des IMT unter Leitung von Michael Krause). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte durch Birgit Samans.

3.2.2.1 Genomweite Auswirkung gehemmter *H2A.Z*-Expression auf MYC-Zielgene

Um die Auswirkung gehemmter Expression von *H2A.Z* auf MYC-Zielgene zu beobachten, wurde ein cDNA-Microarray-Versuch mit RNA-Proben aus Osteosarkomzellen, die das MycER-Fusionsprotein und je entweder eine unspezifische shRNA-Sequenz oder eine gegen das Transkript von *H2A.Z* gerichtete shRNA-Sequenz exprimieren, durchgeführt. Dies geschah mit der Sequenz shh2az-1, da die stärker depletierende Sequenz shh2az-uni zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand. Es wurde jeweils die relative Expression von c-MYC-Zielgenen nach Aktivierung von MycER gemessen. Nach Expression von shh2az-1 wurde, verglichen mit einer Kontroll-shRNA (shscr) exprimierenden Zellen, sowohl die Aktivierung als auch die Repression eines Großteils der betrachteten c-MYC-Zielgene vermindert (siehe Abb. 3.12 auf der vorherigen Seite sowie Tab. D.1 auf Seite 117 und D.2 auf Seite 118 im Anhang). Dieser Versuch gibt wegen der verwendeten *flip color*-Technik bei der Microarray-Analyse jedoch keinen Aufschluß über Änderungen der basalen Expressionsniveaus der Gene, da lediglich die Expressionsniveaus mit und ohne 4-OHT-Zugabe unter Einfluß der Expression einer einzelnen shRNA-Sequenz verglichen wurden, jedoch nicht Unterschiede der Expressionsniveaus von Genen zwischen zwei verschiedenen shRNA-Sequenzen.

3.2.2.2 Auswirkung gehemmter *H2A.Z*-Expression auf die Expression einzelner MYC-Zielgene in humanen Osteosarkomzellen

Zur Validierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse *H2A.Z*-depletierter Osteosarkomzellen wurde aus denselben RNA-Proben cDNA hergestellt und die relative Expression der MYC-Zielgene *CCND2*, *NCL*, *ODC*, *PTMA* und *P21CIP1* gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.13 auf der nächsten Seite dargestellt. Es wird ersichtlich, daß bei Expression der gegen *H2A.Z* gerichteten shRNA-Sequenz die Aktivierung von *CCND2*, *NCL*, *ODC* und *PTMA* (Prothymosin α) in deutlich schwächerem Maße stattfindet, wobei die basalen Expressionsniveaus erhöht sind; die Repression von *P21CIP1* durch MycER findet in den shRNA-exprimierenden Zellen nicht mehr statt, und auch hier ist das basale Expressionsniveau erhöht. Diese Beobachtungen stimmen mit denen aus der Microarray-Analyse überein.

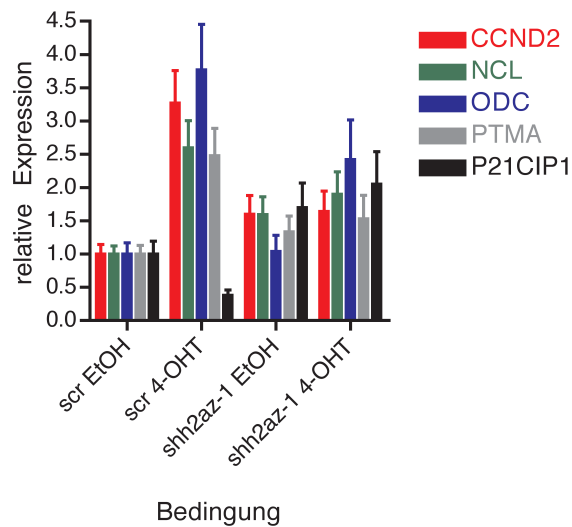


Abb. 3.13: Auswirkung gehemmter Expression von *H2A.Z* auf MYC-Zielgene in humanen Osteosarkomzellen. U2OS MycER K9-Zellen wurden mit einer unspezifischen (shscr) oder einer shRNA-Sequenz gegen das Transkript von *H2A.Z* exprimierenden retroviralen Vektoren infiziert und nach Puromycin-Selektion unter Serummangelbedingungen das MycER-Fusionsprotein für jeweils 6 h durch Zugabe von 200 nM 4-OHT aktiviert bzw. durch Zugabe des Lösungsmittels (Ethanol) nicht aktiviert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgte eine Bestimmung der relativen Transkriptmengen von *CCND2*, *NCL*, *ODC*, *PTMA* und *P21CIP1* unter Normalisierung auf das *S14*-Transkript mittels qPCR.

3.2.2.3 Auswirkung gehemmter *h2a.z*-, *p400*- oder *srcap*-Expression auf die Expression von *ccnd2* in Mausfibroblasten

Um den Austauschfaktor für H2A.Z zu identifizieren, wurde die Auswirkung shRNA-vermittelter Hemmung der Expression von *p400* und *srcap* auf die Aktivierung des c-Myc-Zielgens *ccnd2* untersucht, dessen Expressionsniveau durch *h2a.z-knockdown* ansteigt und nicht weiter durch Aktivierung von MycER gesteigert werden kann. Ein *knockdown* von *p400* oder *srcap* zeigt nicht denselben Effekt, *ccnd2* bleibt weiterhin durch 4-OHT induzierbar.

Der Effekt der verwendeten shRNA-Sequenz auf die Menge des *h2a.z*-Transkripts ist nicht oder nur schwach sichtbar, was Beobachtungen aus vorhergehenden Experimenten entspricht.

Die Expression von *h2a.z*, *p400* und *srcap* wird durch Aktivierung von MycER gesteigert, und ein *knockdown* von *h2a.z* erhöht die Transkriptmengen von *p400* und *srcap*. Bei Depletion von *p400*-Transkripten wurde eine Erhöhung der *srcap*-Transkriptmenge

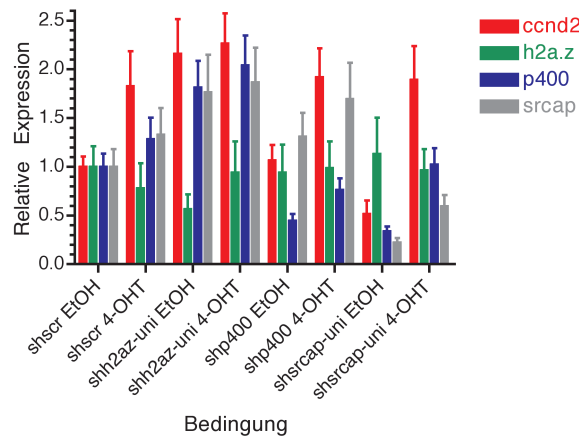


Abb. 3.14: Auswirkung gehemmter Expression von *h2a.z* auf MYC-Zielgene in Mausfibroblasten. p27^{-/-} 3T3 MycER K3-Zellen wurden mit einer unspezifischen (shscr) oder shRNA-Sequenzen gegen die Transkripte von *h2a.z*, *p400* oder *srcap* exprimierenden retroviralen Vektoren infiziert und nach Blasticidin-Selektion unter Serumangelbedingungen das MycER-Fusionsprotein für jeweils 6 h durch Zugabe von 200 nM 4-OHT aktiviert bzw. durch Zugabe des Lösungsmittels (Ethanol) nicht aktiviert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgte eine Bestimmung der relativen Transkriptmengen von *ccnd2*, *h2a.z*, *p400* und *srcap* unter Normalisierung auf das *s16*-Transkript mittels qPCR.

beobachtet, bei Depletion von *srcap*-Transkripten jedoch eine gleichzeitige Reduktion der *p400*-Transkriptmenge.

3.2.3 Biologische Relevanz

Die Auswirkung gehemmter Expression von *h2a.z* sowie seiner Austauschfaktoren wurde in verschiedenen Zellsystemen getestet. Hierzu wurde in verschiedenen Zellsystemen shRNA-vermittelte Hemmung der Expression von murinem *h2a.z*, *p400* und *srcap* sowie humanem *H2A.Z* und *SRCAP* durchgeführt.

3.2.3.1 RNAi gegen *h2a.z* in Mausfibroblasten

Ein effektiver *knockdown* von *h2a.z* in p27^{-/-} 3T3 MycER puro K3-Zellen führte zu einem nahezu vollständigen Wachstumsarrest, wie Abb. 3.15 auf der nächsten Seite in einem Kolonie-Assay zeigt. In 3T3 MycER puro-Zellen war der Effekt im Fall von shh2az-1 kaum, im Fall von shh2az-uni jedoch immer noch deutlich ausgeprägt.

In U2OS-Zellen war ein ähnlich starker Wachstumsarrest zu verzeichnen (nicht gezeigt). Die Expression einer effektiven shRNA-Sequenz gegen *srcap* führte in p27^{-/-} 3T3 MycER puro K3-Zellen zu einem nahezu vollständigen Wachstumsarrest, die Expression einer effektiven shRNA-Sequenz gegen *p400* ebenfalls (nicht gezeigt). Auch in 3T3 MycER puro-Zellen führte die Expression einer effektiven shRNA-Sequenz gegen *p400* zu einem deutlichen Wachstumsarrest.

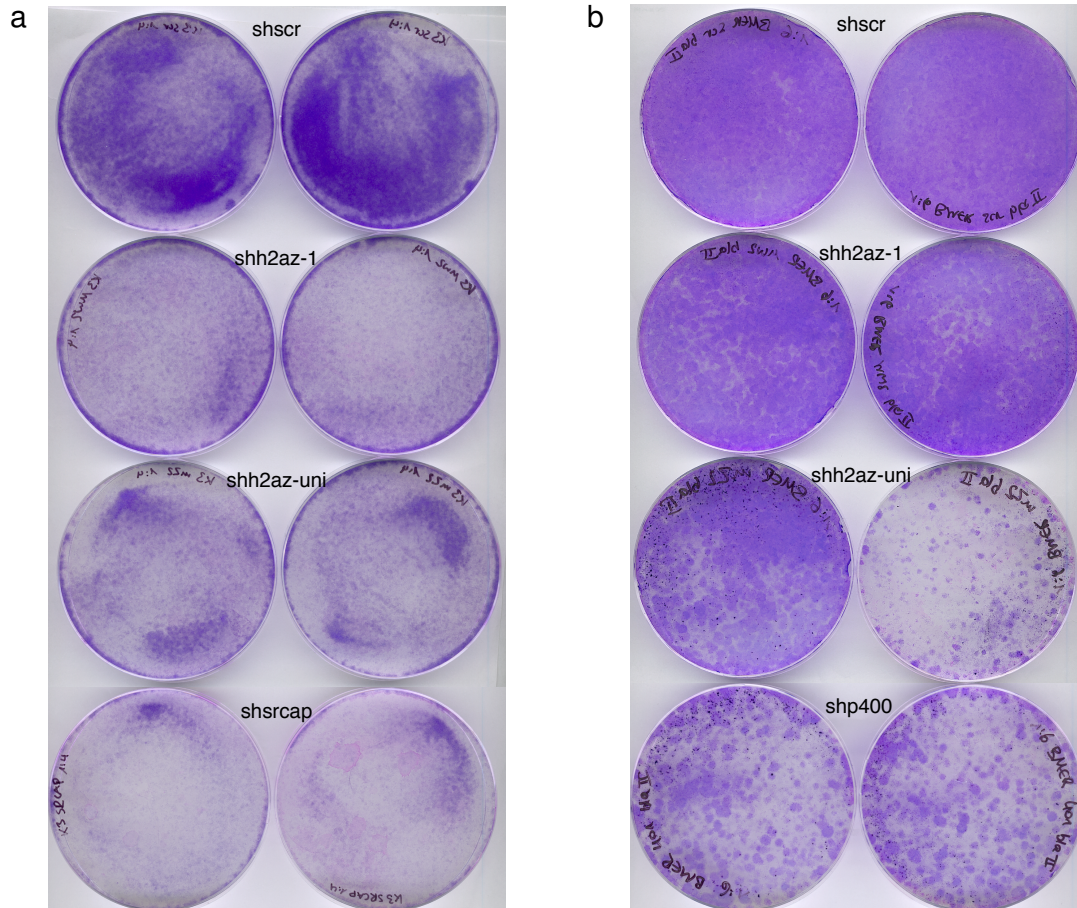


Abb. 3.15: Auswirkung gehemmter Expression von *h2a.z* auf die Kolonienbildung von Mausfibroblasten. p27^{-/-} 3T3 MycER K3-Zellen **(a)** und 3T3 MycER puro-Zellen **(b)** wurden mit Vektoren infiziert, die die angezeigten shRNA-Sequenzen exprimierten, nach Blasticidin-Selektion fixiert und als Doppelbestimmung angefärbt, sobald die Zellen in einer der Schalen konfluent gewachsen waren.

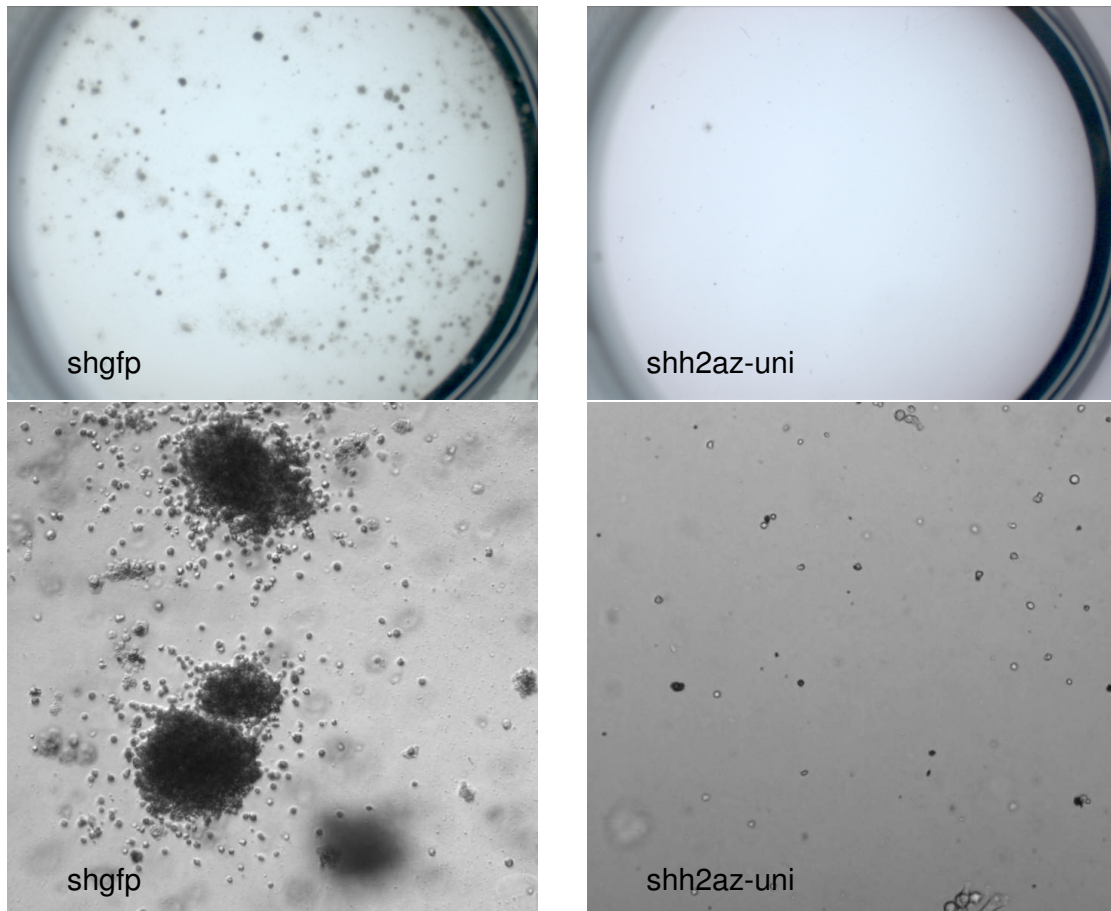


Abb. 3.16: Wachstumsarrest von murinen myeloiden Progenitoren durch gehemmte Expression von *h2a.z*. Durch Expression des leukämieassoziierten Fusionsproteins MLL-ENL (*mixed lineage leukemia-eleven nineteen leukemia*) immortalisierte murine myeloide Progenitoren [95] wurden mit Vektoren infiziert, die die Expression einer in Mauszellen funktionellen shRNA gegen *h2a.z* (shh2az-uni) oder einer irrelevanten shRNA (shgfp) bewirken. Nach Selektion wurden die Zellen in semisolidem Methylzellulose-Medium, welches ihre Migrationsfähigkeit einschränkt, ausplattiert und ihre Fähigkeit, darin Kolonien zu bilden, untersucht. Oben ist jeweils die gesamte Zellpopulation, unten ein vergrößerter Ausschnitt derselben abgebildet. Durchgeführt und ausgewertet von Sovana Adhikary.

3.2.3.2 RNAi gegen *h2a.z* in MLL-ENL-immortalisierten myeloiden Progenitoren

Ein *knockdown* der *h2a.z*-Expression in myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Maus bewirkte ein nahezu vollständiges Ausbleiben ihrer Fähigkeit, unter Einfluß von Zytokinen in semisolidem Medium Kolonien zu bilden, während Zellen,

die eine irrelevante shRNA-Sequenz exprimieren, zur Bildung von Kolonien fähig sind. Dies ist in Abb. 3.16 auf der vorherigen Seite dargestellt.

3.3 Charakterisierung der Interaktion von c-MYC mit MED24

3.3.1 Expressionsanalysen

Um die Auswirkung gehemmter Expression von *med24* auf MYC-Zielgene zu bestimmen, wurde eine genomweite Expressionsanalyse (cDNA-Microarray) durchgeführt. Sowohl Genaktivierung als auch -repression durch MycER fand nach einem *knockdown* von *med24* nur noch in vermindertem Maße statt.

Dies ist in Tab. 3.2 auf der nächsten Seite sowie Abb. 3.17 auf der nächsten Seite dargestellt. Die gewählte *flip color*-Meßmethode gestattet hier jedoch keinen Rückschluß auf Änderungen der basalen Expressionsniveaus von Genen, da jeweils die Zustände mit und ohne 4-OHT, nicht aber die shscr- und shmed24-exprimierenden Zellpopulationen miteinander verglichen wurden.

Nach cDNA-Synthese aus denselben RNA-Proben konnten diese Expressionsdaten für einige Gene validiert werden, wie Abb. 3.18 auf Seite 81 zeigt. Hier wird zudem ersichtlich, daß das Expressionsniveau der c-MYC-Zielgene *itm2a*, *eef1a1*, *ephx1* und *golp3* nach *knockdown* von *med24* im Vergleich zur shscr-Probe erhöht und durch 4-OHT-Zugabe nicht weiter zu steigern ist. Die Expression von *ccnd2*, *odc* und *npm1* war ebenfalls nach einem *knockdown* von *med24* nicht signifikant zu steigern, jedoch war das basale Expressionsniveau dieser Gene nicht oder nur in geringem Maße durch den *knockdown* von *med24* beeinflusst. Die Expression von *ncl* zeigt intermediäre Merkmale, d.h. durch den *knockdown* von *med24* ist das Expressionsniveau leicht erhöht, die Induzierbarkeit durch 4-OHT ist vermindert. Das in den Kontrollzellen durch MycER reprimierte Gen *hs6st2* war in Zellen mit gehemmter Expression von *med24* bereits ohne 4-OHT-Zugabe stark in seiner Expression reduziert. Die Auswirkung gehemmter Expression von *med24* war für die betrachteten Gene identisch mit der Auswirkung gehemmter Expression von *cdk8*.

Effekt von 4-OHT in shscr-infizierten Zellen relativ zum Effekt von Ethanol (1871 Gene >3× reguliert)	Effekt von 4-OHT in shmed24-infizierten Zellen relativ zum Effekt von Ethanol in shscr-inf. Zellen
764 Gene >3× induziert (41 %)	starke Induktion (>3×): 1 reduzierte Induktion (<3×): 49 (6 %) keine Induktion (<1,5×): 627 (82 %) schwache Repression (<0,66×): 86 (11 %) starke Repression (<0,33×): 1
1107 Gene <0,33× reprimiert (59 %)	reduzierte Repression (<0,66×): 2 keine Repression (>0,66×): 1093 (99 %) schwache Induktion (>1,5×): 12 (1 %)

Tab. 3.2: Auswirkung gehemmter Expression von med24 auf Myc-Zielgene. NIH3T3 MycER Klon 1–Zellen wurden mit einer unspezifische (shscr) oder eine gegen das Transkript von med24 gerichtete shRNA-Sequenz exprimierenden retroviralen Vektoren infiziert und nach Puromycin-Selektion unter Serumangelbedingungen das MycER-Fusionsprotein durch Zugabe von 200 nM 4-OHT aktiviert bzw. durch Zugabe des Lösungsmittels (Ethanol) nicht aktiviert. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde in mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte cRNA umgeschrieben und an auf einen Objektträger aufgebraachte cDNA-Sequenzen, welche 20000 Gene der Maus repräsentieren, hybridisiert (Microarray-Arbeitsgruppe des IMT unter Leitung von Dr. Michael Krause). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte durch Birgit Samans.

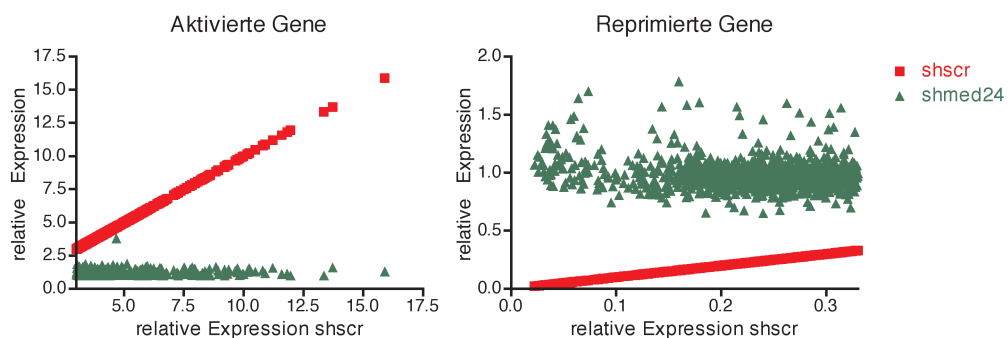


Abb. 3.17: Genomweite Auswirkung gehemmter Expression von med24 auf Myc-Zielgene in Mausfibroblasten. NIH3T3 MycER Klon 1–Zellen wurden mit einer unspezifische (shscr) oder eine gegen das Transkript von med24 gerichtete shRNA-Sequenz exprimierenden retroviralen Vektoren infiziert und nach Puromycin-Selektion gehungert. Das MycER-Fusionsprotein durch Zugabe von 200 nM 4-OHT aktiviert bzw. durch Zugabe des Lösungsmittels (Ethanol) nicht aktiviert. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde in mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte cRNA umgeschrieben und auf einem Objektträger an cDNA-Sequenzen, welche 20000 Gene der Maus repräsentieren, hybridisiert (Microarray-Gruppe des IMT unter Leitung von Michael Krause). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte durch Birgit Samans. Dargestellt ist die relative Expression von Genen unter Einfluß von 4-OHT in shscr- und in shmed24-infizierten Zellen.

3.3.2 Keine Veränderung der S-Phase–Induktion durch MycER nach Depletion von Med24 in NIH3T3-Zellen

Dorothea Maaß konnte zeigen, daß die Hemmung der Expression von *MED24* in humanen Osteosarkomzellen durch vektorbasierte RNA-Interferenz die Induktion der etablierten MYC-Zielgene *CCND2* und *NCL* durch MycER verhinderte. Desweiteren zeigte eine genomweite Expressionsanalyse (cDNA-Microarray), daß in denselben Zellen sowohl Genaktivierung als auch -repression durch MycER nach einem *knock-down* von *MED24* nur noch in vermindertem Maße stattfand. Trotzdem konnte nicht gezeigt werden, daß die Induktion der Zellzyklusprogression durch MycER signifikant gehemmt oder verlangsamt wurde [59]. Hier sollte in einem murinen Zellsystem der Effekt einer funktionellen shRNA gegen das Transkript von *med24* untersucht werden. Die durchflußzytometrische Analyse der entsprechend behandelten Zellen zeigte, daß auch immortalisierte Mausfibroblasten, die das MycER-Fusionsprotein exprimieren,

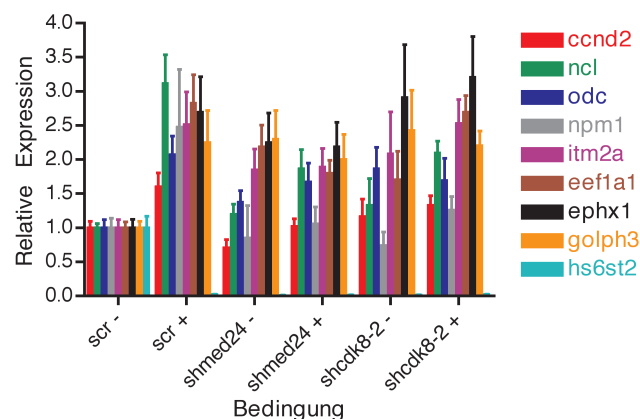


Abb. 3.18: Die Auswirkung gehemmter Expression von Mediator-Untereinheiten auf die Expression von c-MYC–Zielgenen in Mausfibroblasten. NIH3T3 MycER K1-Zellen wurden retroviral mit Vektoren infiziert, die die angezeigten shRNA-Sequenzen (scr, scrambled; shmed24; shcdk8-2) sowie einen Selektionsmarker exprimieren. Nach drei Tagen Selektion wurden die Zellen unter Aufrechterhaltung der Selektion für drei weitere Tage gehungert, danach erfolgte eine Zugabe von 200 nM 4-OHT (+) oder dessen Lösungsmittel (–) zum Medium für 6 h. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgte eine Expressionsanalyse mittels qPCR unter Nutzung von Primer-Sequenzen zur Amplifikation der angezeigten cDNA-Sequenzen. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zum vom experimentellen System nicht beeinflussten Haushaltsgen *s16*.

weder vor noch nach Stimulation mit 4-OHT eine signifikante Veränderung der Verteilung im Zellzyklus aufweisen, wie in Abb. 3.19 dargestellt ist.

3.3.3 MYC rekrutiert den Mediator-Komplex mit CDK8-Modul an Promotoren von Zielgenen

Um den Mechanismus der c-MYC-vermittelten, Mediator-abhängigen Genaktivierung zu untersuchen, wurde die Bindung des Mediator-Komplexes bzw. dessen Untereinheit MED1 sowie des fakultativen CDK8-Moduls an die Promotoren von MYC-Zielgenen gemessen. ChIP-Experimente mit humanen Osteosarkomzellen (U2OS) zeigten, daß nach Aktivierung des MycER-Fusionsproteins die Mediator-Untereinheiten MED1 und CDK8 an die MYC-gebundenen E-Boxen der Promotoren der MYC-Zielgene *CCND2* und *NCL* rekrutiert wurden, wie in Abb. 3.20 auf der nächsten Seite dargestellt ist. Die Rekrutierung der Mediator-Untereinheiten ging mit der Bindung des MycER-Fusionsproteins einher. In einer intergenischen Kontrollregion konnte weder eine Bindung von MycER noch der Mediator-Untereinheiten MED1 und CDK8 gezeigt werden.

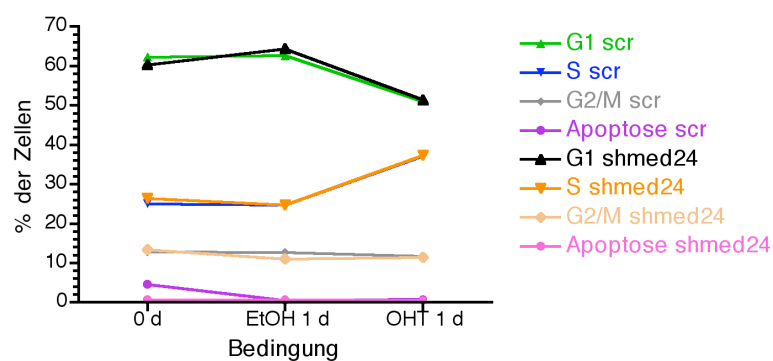


Abb. 3.19: Induktion der Zellzyklusprogression durch MycER in Med24-depletierten Mäusfibroblasten. NIH3T3 MycER K1-Zellen wurden mit Vektoren infiziert, die für eine shRNA-Sequenz gegen das Transkript für *med24* (shmed24) oder für eine irrelevante shRNA-Sequenz (scr) kodieren. Nach Selektion und Hungern der Zellen wurde durch Versetzen mit 200 nM 4-OHT das MycER-Fusionsprotein aktiviert und nach Fixierung und Propidiumjodidfärbung deren Zellzyklusprofil durchflußzytometrisch mit dem von Zellen verglichen, die statt mit 4-OHT nur mit Ethanol behandelt wurden.

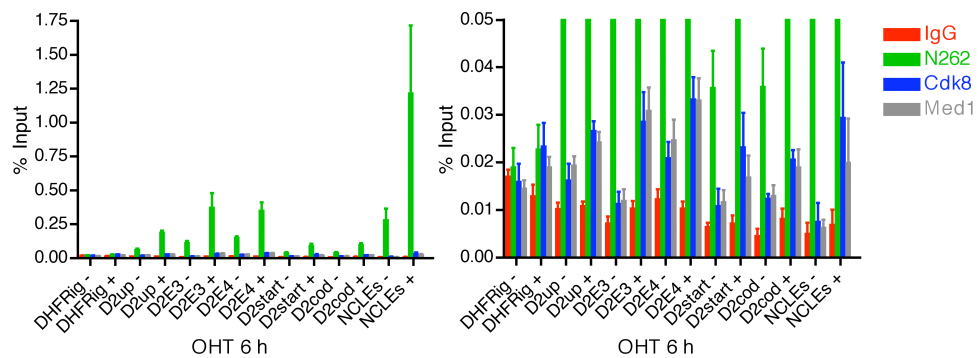


Abb. 3.20: Rekrutierung des Mediator-Komplexes an Promotoren von MYC-Zielgenen in Osteosarkomzellen. U2OS MycER Klon 9-Zellen wurden für 6 h entweder mit 200 nM 4-OHT oder mit Ethanol behandelt und damit ein ChIP-Experiment mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Die mittels qPCR gemessene Bindung an die jeweiligen genomischen Regionen (DHFRig: intergenische Region nahe des Gens für die Dihydrofolatreduktase; D2up: *upstream*-Region des *CCND2*-Promotors (-2000); D2E3: E-Box 3 des *CCND2*-Promotors (-1200); D2E4: E-Box 4 des *CCND2*-Promotors (-600); D2start: Transkriptionsstart von *CCND2* (0); D2cod: kodierende Region von *CCND2* (+5000); NCLEs: E-Boxen im ersten Intron von *NCL* (+700)) ist aufgrund der unterschiedlichen Signalintensitäten auf zwei verschiedene Skalen aufgetragen.

4 Diskussion

4.1 Identifikation MIZ-1–assoziierter Proteine

Die aus der chromatographischen Reinigung des MIZ-1–Komplexes resultierende Liste von putativen Interaktoren umfaßte erwartungsgemäß nukleäre Proteine, die in Komplexen organisiert sind. Sie konnte nach stringenter Auswahl, d.h. Bildung einer Schnittmenge von Kandidaten, die mit verschiedenen Ansätzen als putative Bindungspartner von c-MYC (Koch und Kollegen) [91] oder MIZ-1 (Jens-Peter Reese) [65] oder als funktionelle Kofaktoren von MIZ-1 (Steffi Herold, persönliche Mitteilung) gefunden wurden, teilweise validiert werden. Die chromatographische Reinigung des MIZ-1–Komplexes war somit erfolgreich; aus ihr gingen Mi2 β /CHD4 und IRS4 als bestätigte Bindungspartner hervor — beide Proteine können an c-MYC binden, eine Bindung an MIZ-1 konnte nicht gezeigt werden, was technische Gründe haben könnte.

Im Falle von Mi2 β /CHD4 ist von Interesse, daß andere Untereinheiten des NuRD-Komplexes ebenfalls massenspektroskopisch in den MIZ-1–haltigen Fraktionen identifiziert wurden. Mi2 β /CHD4 kann auch in anderen Komplexen vorliegen, d.h. die hier gezeigte Bindung von c-MYC an Mi2 β /CHD4 ist wahrscheinlich Ausdruck einer Wechselwirkung von c-MYC mit dem NuRD-Komplex. Mi2 β /CHD4 wurde von Koch *et al.* ebenfalls als Interaktor von c-MYC identifiziert [91].

Desweiteren wurde hier IRS4 als Bindungspartner von c-MYC durch eine endogene KoIP bestätigt. Koch und Kollegen überprüften diesen Kandidaten nach der massenspektrometrischen Identifizierung nicht mit weiteren Experimenten.

4.1.1 Mi2 β /CHD4

Der NuRD-Komplex beinhaltet enzymatische Aktivitäten, die Histone deacetylieren und auf ATP-abhängige Weise Chromatin umgestalten können; diese Aktivitäten wirken durch Entfernung aktivierend wirkender Acetylgruppen an Histonen und durch Störung der nukleosomenfreien Region an der Transkriptionsstartstelle vieler Promotoren reprimierend auf diese, indem die Chromatinstruktur geschlossener wird [96]. Die mögliche Interaktion von c-MYC mit dem NuRD-Komplex suggeriert einen Mechanismus der Repression von Zielgenen durch c-MYC, d.h. durch Rekrutierung des Komplexes an Promotoren. Diese Hypothese wäre durch ChIP-Experimente und funktionelle Expressionsanalysen überprüfbar, was Aufschluß über mögliche derart regulierte Zielgene geben könnte.

4.1.2 IRS4

Die IRS(Insulinrezeptorsubstrat)-Proteinfamilie umfaßt bislang sechs Mitglieder, welche in ihrem Expressionsmuster deutliche Unterschiede zeigen. IRS1 und IRS2 werden in vielen Geweben, IRS3 in Adipozyten und im Gehirn, IRS4 in embryonalen Geweben und Zelllinien exprimiert. IRS5 und IRS6 scheinen ein geringes Expressionsniveau und wenige Funktionen in der Signalweiterleitung zu haben. IRS-Proteine können durch die Tyrosinkinaseaktivität des ligandengebundenen Insulinrezeptors phosphoryliert werden und werden daraufhin von intrazellulären Proteinen gebunden, die geeignete SH2(Src–Homologie-Region 2)-Domänen enthalten, wie etwa PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), GRB2 (*growth factor receptor binding protein 2*), SHP2 (SH2-enthaltende Tyrosinphosphatase 2) und FYN (FGR/YES-verwandtes neues Gen). Vermittelt durch derartige Bindungen werden der PI3K-PKB(Proteinkinase B)– und der RAS(Rattensarkom)-MAPK(mitogenaktivierte Proteinkinase)–Signalweg aktiviert. Die IRS-Proteine können an Serinresten phosphoryliert werden, was eine negative Wirkung auf die Signalweiterleitung hat [97]. Zusätzlich zu Funktionen im Zytoplasma kann IRS1 in Mausfibroblasten in den Zellkern wandern und dort an die Promotoren von *CCND1* (Zyklin D1) und c-MYC und den *rDNA*-Promotor binden und deren Transkription aktivieren [98, 99].

IRS4 kann sowohl an der Plasmamembran, im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert sein (Jean-François Naud und Theresia Kreß, unpublizierte Daten). Möglicherweise

spielt auch IRS4 eine Rolle bei der direkten Regulation transkriptioneller Prozesse und interagiert mit c-MYC, MIZ-1 oder beiden Proteinen auf Promotoren; diese Hypothese ließe sich durch funktionelle Expressionsanalysen und Promotorbindungsstudien überprüfen.

In HEK293-Zellen ist IRS4 stark exprimiert und bindet an PI3K und GRB2, und eine ca. 160 kDa große Form wird durch den Insulinrezeptor an Tyrosinresten phosphoryliert [93]. In HepG2-Zellen wird ebenfalls nach Insulinrezeptorstimulation die ca. 160 kDa große Form phosphoryliert, diese bindet jedoch nicht an PI3K, GRB2, SHP2 und PKC (Proteinkinase C). Trotzdem ist IRS4 für die Aktivierung der PI3K- und RAS-Signalwege und die nachfolgende ERK(extrazelluläre Signale-regulierte Kinase)-Aktivierung notwendig, wie Depletionsexperimente zeigten [100]. Außerdem interagiert IRS4 in HEK293-Zellen mit dem Protein IRAS (Imidazolinrezeptor-Antisera-selektiert), welches an der IRS4-abhängigen ERK-Aktivierung beteiligt zu sein scheint. Putative weitere Interaktoren sind u.a. 14-3-3-Proteine [101]. 14-3-3-Proteine können andere Proteine ins Zytoplasma sequestrieren oder ihre Funktion modulieren [102]; so kann etwa 14-3-3 η an phosphoryliertes MIZ-1 binden und dessen Bindung an DNA inhibieren [62]. Möglicherweise wird auch die Aktivität bzw. die Lokalisation von IRS4 durch 14-3-3-Proteine reguliert, diese Hypothese wäre durch Expressionsanalysen und Immunfärbungen überprüfbar.

In *Drosophila* kontrolliert Chico, ein zu IRS1–4 homologes Protein, die Größe von Zellen und Organen [103]. *Drosophila* Myc (dMyc) ist ebenfalls ein Regulator der Zellgröße [104]. Um zu überprüfen, ob die Regulation der Zellgröße durch Chico und dMyc abhängig voneinander, d.h. kooperativ stattfindet, könnte die Überexpression von *chico* in *dmyc*-defizienten Fruchtfliegen und umgekehrt die Überexpression von *dmyc* in *chico*-defizienten Fruchtfliegen Aufschluß geben. Desweiteren wäre eine direkte Interaktion von dMyc und Chico möglich, was durch KoIP-Experimente geklärt werden könnte.

c-Myc ist ebenfalls ein Regulator der Größe von Herzmuskelzellen der Maus, was abhängig von dessen Aktivierung von *ccnd2* geschieht [105]. Murine Herzmuskelzellen wären somit ein geeignetes Modellsystem, um die hypothetische Kooperation von c-Myc und Irs4 bei der Regulation der Zellgröße zu untersuchen. Ebenfalls ist möglich, daß keine direkte Kooperation stattfindet, sondern daß IRS4 an der RAS-abhängigen Induktion von c-MYC beteiligt ist, was möglicherweise therapeutische Ansätze für c-MYC-abhängige Tumoren aufzeigen würde.

4.2 c-MYC–vermittelter Austausch von H2A.Z

In Maus- und Rattenfibroblasten sowie in einer humanen Osteosarkomzelllinie konnte ein durch MycER vermittelter Austausch von H2A.Z gezeigt werden. Desweiteren bewirkte shRNA-vermittelte Hemmung der Expression von *H2A.Z* einen Wachstumsstopp von humanen Osteosarkomzellen und 3T3-immortalisierten Mausfibroblasten; in myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Maus, welche durch Expression von *MLL-ENL* reversibel immortalisiert wurden, war der Wachstumsstopp besonders drastisch. Der durch MLL-ENL vermittelte Arrest der Differenzierung ist in diesem Zellsystem abhängig von Myc [95]. Eine besondere Empfindlichkeit der Zellen gegenüber einem Verlust von H2A.Z läßt eine Abhängigkeit der Myc-vermittelten Immortalisierung von H2A.Z vermuten.

Eine shRNA-vermittelte starke Herunterregulation von *H2A.Z* bewirkte einen Anstieg des Expressionsniveaus von aktivierten Myc-Zielgenen, eine schwache Herunterregulation bewirkte eine stark verminderte Wirkung von MycER bei Aktivierung durch 4-OHT. In beiden Fällen war kein Effekt von 4-OHT mehr zu beobachten, d.h. H2A.Z scheint in den betrachteten Zellsystemen essentiell für die Genregulation durch c-MYC zu sein. Es ist vonnöten, weitere shRNA-Sequenzen gegen *h2a.z* und *H2A.Z* zu etablieren, um unspezifische Effekte der verwendeten Sequenzen auszuschließen. Die hier verwendeten retroviralen Vektoren führten zu einer zwischen den Experimenten schwankenden Stärke der Depletion von H2A.Z, was zur Folge hatte, daß der Effekt auf die Transkription von MYC-Zielgenen ebenfalls variierte. Die Anfälligkeit des experimentellen Systems führte dazu, daß die für die Fortführung des Projektes notwendigen Expressionsanalysen abgebrochen wurden. Voraussetzung für weitere Experimente ist ein Werkzeug, welches einen reproduzierbaren starken *knockdown* der über lange Zeit stabilen Histonvariante H2A.Z ermöglicht.

Im Laufe der Anfertigung dieser Arbeit wurde ein durch Transkriptionsfaktoren hervorgerufener Austausch von H2A.Z an den Promotoren von Zielgenen durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt [106, 107]. Gévry und Kollegen wiesen am Promotor von *P21CIP1* einen P53-vermittelten Austausch von H2A.Z nach [106]. Es wurde eine stärkere Bindung von H2A.Z an den Promotor an der P53-Bindungsstelle in *P53* wt-Zellen im Vergleich zu *P53*-defizienten Zellen nachgewiesen; bei Aktivierung von P53 durch die Effekte von Daunorubicin (Interkalation in DNA und Hervorrufen von Strangbrüchen) kommt es zu einem Verlust der H2A.Z-Bindung an der P53-

Bindungsstelle während der Aktivierung von *P21CIP1*. Diese Beobachtungen entsprechen den in Abb. 3.7 auf Seite 68 in *myc*-defizienten und *myc* wt-Rattenfibroblasten gezeigten. Vermutlich aufgrund des zeitlich weniger fein regulierbaren Zellsystems und des Mangels der Möglichkeit, die Bindung von P53 an den Promotor von *P21CIP1* gänzlich zu unterbinden, beobachteten die Autoren nicht die hier gezeigte relativ schnelle Rekrutierung und den ebenso relativ schnell erfolgenden Verlust von H2A.Z. Der Mechanismus der Rekrutierung und des direkt darauf erfolgenden Verlustes von H2A.Z ist in Abb. 4.1 grafisch dargestellt.

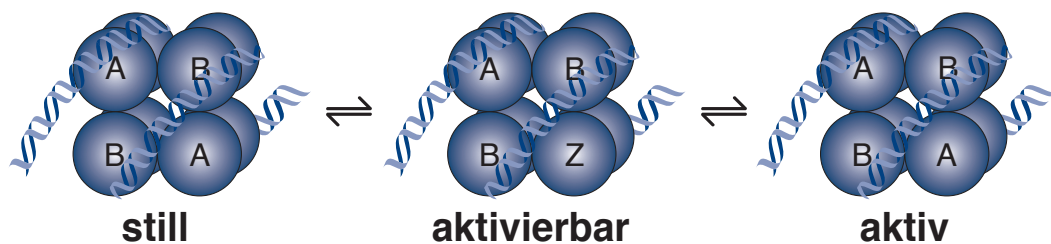


Abb. 4.1: Modell für die Regulation der Transkription durch Inkorporation von H2A.Z. Schematisch dargestellt ist ein Nukleosom an einer regulatorisch relevanten Position, dessen Zusammensetzung sich je nach Zustand der Promotor-Region eines Gens ändert. Im stillen, d.h. transkriptionell inaktiven Zustand des Promotors besteht es aus zwei H2A-H2B-Dimeren und einem H3-H4-Tetramer (letzteres im Hintergrund), im aktivierbaren Zustand wird mindestens ein H2A-H2B-Dimer gegen ein H2A.Z-H2B-Dimer ausgetauscht, und im aktiven Zustand enthält das Nukleosom wieder zwei H2A-H2B-Dimere.

Gévry *et al.* beschreiben eine dem Verlust von H2A.Z und P400 an der P53-Bindungsstelle des *P21CIP1*-Promotors nachfolgende Rekrutierung von TIP60, die mit dem Ansteigen der Expression von *P21CIP1* einhergeht und das Vorhandensein getrennter P400- und TIP60-Komplexe nahelegt. Außerdem konnten sie zeigen, daß der nach Depletion von H2A.Z auftretende Wachstumsarrest der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus stattfindet und durch ein P53-vermitteltes Ansteigen der Expression von *P21CIP1* verursacht wird. In weiteren Versuchen wurde P400 *in vivo* als Austauschfaktor von H2A.Z an P53-Bindungsstellen und *in vitro* als genereller ATP-abhängiger Austauschfaktor von H2A.Z identifiziert. Zusätzlich zum H2A.Z-Austausch bei der Genaktivierung durch P53 wurde eine Rekrutierung von H2A.Z bei der Repression von *P21CIP1* durch c-MYC beschrieben. Dies stimmt mit in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen überein, die zeigen, daß nach Depletion von H2A.Z die Expression reprimierter c-MYC-Zielgene ansteigt, darunter auch *P21CIP1* (siehe Abb. 3.12 auf Sei-

te 73). *P21CIP1* wurde von Gévry *et al.* ebenfalls als durch H2A.Z-Depletion in seiner Expression gesteigertes Gen beschrieben. Das erwähnte gleichbleibende basale Expressionsniveau anderer P53-Zielgene steht im Kontrast zu den hier gezeigten Änderungen der Expressionsniveaus von c-MYC–Zielgenen nach H2A.Z-Depletion, welche nach Teildepletion schwächer MYC-abhängig aktiviert, nach starker Depletion MYC-unabhängig aktiviert sind.

Desweiteren wurde gezeigt, daß der Glucocorticoidrezeptor, ein Mitglied der Familie der Kernrezeptoren, in Mauszellen nach Ligandenbindung einen Verlust von H2A.Z an Promotoren von Zielgenen verursacht, welcher etwa 50–60 % der Gleichgewichtskonzentration beträgt [107]. Dies ist vergleichbar mit den in dieser Arbeit gezeigten Abnahmen an den Promotoren von MYC-Zielgenen. H2A.Z ist außerdem an Bindungsstellen des Glucocorticoidrezeptors angereichert. Ein Artikel von Farris *et al.* beschreibt den Austausch von H2A.Z in der Promotor- und der kodierenden Region von c-MYC während der Genaktivierung [108]. *H2A.Z* ist ein Zielgen von c-MYC [15]; H2A.Z wirkt reprimierend auf die Expression von c-MYC [108], d.h. H2A.Z ist an der Autorepression von c-MYC beteiligt.

In *C.elegans* kann H2A.Z durch den Transkriptionsfaktor PHA-4 an Promotoren von Genen, deren Expression die Entwicklung des Schlunds bewirkt, rekrutiert werden und verursacht dort einen zeitgerechten Beginn der Transkription. Dieser wird durch die orthologen Gene von *esa1/HTATIP* und *swr1* bewirkt; RNAi-vermittelte Herunterregulation dieser Gene oder des Orthologs von *H2A.Z* hatte bei gleichzeitiger Inaktivierung der Expression von *pha-4* eine verzögerte Expression der Gene für die Schlundentwicklung und Letalität zur Folge [109].

In der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) kann H2A.Z von einem zum SWR1-Komplex homologen Proteinkomplex in Chromatin eingesetzt werden; die genetische Deletion von Komponenten des Komplexes führt zu kleineren Blättern und verfrühter Blütenbildung, da die Expression des Repressors FLC (*flowering locus C*) vermindert wird, welche durch Inkorporation von H2A.Z im Promotor von FLC reguliert wird [110].

Eine Studie von Lemieux und Kollegen [19] zeigt eine Abhängigkeit der Rekrutierung der Komplexe SWI/SNF, SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) und Mediator von H2A.Z am *GAL1*(Galaktokinase 1)-Promotor von *S.cerevisiae*. In der Bäckerhefe könnte H2A.Z also eine strukturelle Basis des Chromatins für die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie bilden, was das in Abb. 4.1 auf der vorherigen Seite darge-

stellte Modell ebenfalls stützt. Viele Studien deuten darauf hin, daß H2A.Z eine Plattform darstellt, an die Aktivatoren oder Repressoren rekrutiert werden können und die somit den Weg für eine Änderung des Status eines Promotors bereitet.

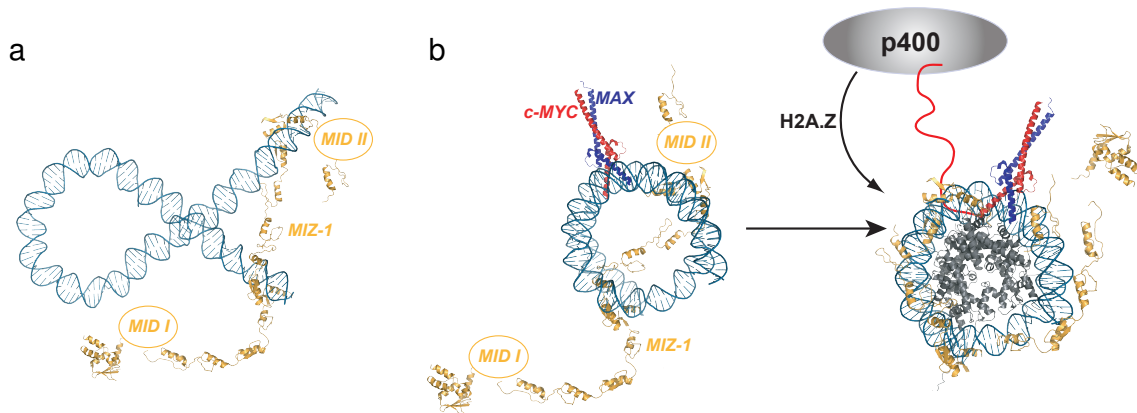


Abb. 4.2: Modell der MYC-vermittelten Repression von MIZ-1-Zielgenen. MIZ-1 ist mit Hervorhebung seiner zwei MYC-interagierenden Domänen (MIDs) dargestellt, **(a)** Bei der Aktivierung der Transkription bindet MIZ-1 an Promotor-DNA und rekrutiert Kofaktoren. **(b)** c-MYC bindet an eine E-Box-Sequenz nahe der MIZ-1-Bindungsstelle, führt über Interaktion mit MIZ-1 zu einer Schließung der DNA und bewirkt über Rekrutierung von p400 eine Inkorporation von H2A.Z, was die Transkription inhibiert. Erstellt von Jean-François Naud.

Mögliche weitere Experimente wären eine starke Depletion von H2A.Z in einem MYC-induzierbaren Zellsystem mit anschließender genomweiter Expressionsanalyse sowie eine genomweite Bindungsstudie von H2A.Z an verschiedenen Zeitpunkten nach Aktivierung von MYC, um das Ausmaß der Abhängigkeit der Genregulation durch MYC von H2A.Z zu bestimmen. Desweiteren ist die eindeutige Identifizierung des oder der putativen Austauschfaktoren von Interesse. Hierzu wären einerseits ein effizienter, auf Proteinebene validierter *knockdown* in Kombination mit Expressions- und ChIP-Analysen von MYC-Zielgenen, andererseits *in vitro* rekonstituierte Systeme von Teilen der für die Aktivierung MYC-regulierter Promotoren notwendigen Maschinen Ansätze für die experimentelle Klärung des Mechanismus. Interessant ist außerdem die Rolle von H2A.Z in der c-MYC–vermittelten Repression, welche bislang wenig untersucht wurde — beschrieben wurde eine Bindung von c-MYC an den Transkriptionsfaktor MIZ-1 und Hemmung von dessen transaktivierender Wirkung [27], es gibt jedoch Hinweise darauf, daß c-MYC bei der Repression auch direkt an DNA bindet (persönliche Mitteilung, Sandra Bernard; unpublizierte Daten, Jean-François Naud), was in Abb. 4.2 als Modell MYC-vermittelter Repression von MIZ-1-Zielgenen darge-

stellt ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß eine shRNA-vermittelte Teildepletion von H2A.Z die MycER-vermittelte Repression von *P21CIP1* verhindert; die von Gévry und Koautoren gezeigte Rekrutierung von H2A.Z an die INR-Region des Promotors [106] scheint also wesentlich für die Repression zu sein. ChIP-Analysen könnten klären, ob c-MYC bei der Repression direkt an DNA bindet. Möglich wäre der Einsatz einer Fusion von c-MYC^{V394D} mit dem Östrogenrezeptor für ein MYC-induzierbares Zellsystem; c-MYC^{V394D} ist eine Mutante, die deutlich schwächer an MIZ-1 bindet [27].

Xiao und Kollegen beschrieben eine Abhängigkeit des Größenwachstums von Herzmuskelzellen der Maus von c-Myc [111], welche laut Zhong und Kollegen abhängig von dessen Induktion von *ccnd2* ist [105]. Eine Studie von Chen *et al.* zeigt eine Abhängigkeit des Größenwachstums von Herzmyozyten der Ratte von H2A.Z [112], was nahelegt, daß die Regulation des Größenwachstums durch c-Myc-vermittelte Induktion von H2A.Z geschieht. Eine Überprüfung dieser Hypothese in einem geeigneten Modellsystem, wie z.B. shRNA-basierte Funktions- und Morphologieanalysen in murinen Herzmuskelzellen, könnte Aufschlüsse über den genauen Mechanismus geben.

4.3 Charakterisierung der Interaktion von c-MYC mit MED24

Sandra Bernard konnte zeigen, daß nach shRNA-vermittelter Depletion von MED24 in HeLa-Zellen eine signifikante Anzahl von MYC-Zielgenen dereguliert war. Ein Großteil dieser deregulierten MYC-Zielgene war in seiner Expression verglichen mit der Kontrollprobe (Expression einer unspezifischen shRNA-Sequenz) vermindert, was im Kontrast zu den von Dorothea Maaß gezeigten Daten in U2OS-Zellen [59] und den hier gezeigten Daten in NIH3T3-Zellen steht (s. Abb. 3.18 auf Seite 81). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß HeLa-Zellen sehr viel c-MYC exprimieren, wohingegen U2OS-Zellen ein relativ geringes Expressionsniveau von c-MYC aufweisen und nicht c-MYC-abhängig sind [113]; auch NIH3T3-Zellen sind nicht abhängig von c-MYC. Die Blockierung von MYC-Bindungsstellen durch endogenes c-MYC in HeLa-Zellen ohne die Möglichkeit, den Mediator-Komplex als Koaktivator zu rekrutieren, könnte zu einer Repression von MYC-aktivierten Zielgenen führen. Desweiteren konnte auch Sandra Bernard den Anstieg des basalen Expressionsniveaus von MYC-Zielgenen nach *MED24-knockdown* in anderen humanen Zelllinien beobachten (persönliche Mit-

teilung).

Das erhöhte basale Expressionsniveau von aktivierten MYC-Zielgenen und die starke Verminderung von MycER-vermittelter Genregulation nach shRNA-vermittelter Depletion von Med24 in murinen NIH3T3-Zellen (s. Abb. 3.18 auf Seite 81) und nach shRNA-vermittelter Depletion von MED24 in humanen U2OS-Zellen [59] weisen darauf hin, daß der Mediator-Komplex eine Rolle bei der Repression von aktivierten MYC-Zielgenen spielt. Dabei ließ sich ein Einfluß von shmed24 auf c-MYC ausschließen [59]. Eine Depletion von Cdk8 in Mausfibroblasten zeigt dieselben Effekte, und CDK8 wird in humanen Osteosarkomzellen MYC-abhängig an Promotoren von Zielgenen rekrutiert (s. Abb. 3.20 auf Seite 83), d.h. die Repression ist vermutlich vom fakultativen CDK8-Modul des Komplexes abhängig. Die Beobachtung, daß CDK8 nach MYC-Bindung, d.h. während der Genaktivierung, an die Promotoren von *CCND2* und *NCL* rekrutiert wird, ist mit einer rein repressiven Rolle des CDK8-Moduls nicht vereinbar; allerdings wurde eine Funktion dieses Moduls in der Genaktivierung bereits beschrieben [37–40].

Die Repression des MYC-Zielgens *hs6st2* scheint ebenfalls abhängig von der Interaktion von c-MYC mit dem Mediator-Komplex zu sein. Nach shRNA-vermittelter Depletion von Med24 oder Cdk8 war die Expression von *hs6st2* unabhängig von der MycER-Aktivierung bereits vollständig reprimiert. Die Analyse der Expression weiterer reprimierter MYC-Zielgene sowie ChIP-Analysen wären möglicherweise aufschlußreich bei der Klärung des Mechanismus der Repression. Außerdem ist es wünschenswert, weitere shRNA-Sequenzen gegen *med24* in Mauszellen und *MED24* in menschlichen Zellen zu etablieren, um unspezifische Effekte der verwendeten Sequenzen auszuschließen.

Die Interaktion von c-MYC mit MED24 wurde von Sandra Bernard gezeigt — es konnte jedoch keine Deletionsmutante von c-MYC hergestellt werden, die nicht mehr an MED24 bindet [53]. Dies deutet darauf hin, daß c-MYC an mindestens zwei Regionen von MED24 gebunden wird. Der umgekehrte Ansatz, d.h. die Herstellung von Deletionsmutanten von MED24, würde möglicherweise eine Mutante hervorbringen, die nicht mehr an c-MYC bindet und bei Überexpression kompetitiv die Bindung von c-MYC an den Mediator-Komplex hemmt; eine solche Mutante sollte, wenn sie ansonsten funktionell ist, eine ähnliche Wirkung wie die shRNA-vermittelte Depletion von MED24 auf MYC-Zielgene haben. Alternativ könnte über die Einführung zufälliger Punktmutationen in die cDNA-Sequenzen von c-MYC und *MED24* eine Mutante mit einem Aminosäureaustausch, welcher die Interaktion zwischen den beiden Proteinen

verhindert, hergestellt werden. Außerdem ist es für weitere Analysen notwendig, einen Antikörper herzustellen, der den Nachweis von endogenem MED24 ermöglicht, was mit dem hier verwendeten kommerziell erhältlichen Antikörper nicht möglich war. Dieser erbrachte auch in ChIP-Experimenten keine spezifischen Signale (nicht gezeigt).

Lemieux *et al.* konnten zeigen, daß in der Bäckerhefe die Rekrutierung des Mediator-Komplexes an den *GAL1*-Promotor abhängig vom Vorhandensein von H2A.Z ist. Diese Beobachtung stützt das Modell, daß H2A.Z als Plattform für die Rekrutierung von Aktivatoren und Repressoren der Transkription dient. ChIP-Experimente in Säugetierzellsystem wären dazu geeignet, zu überprüfen, ob die Rekrutierung des Mediator-Komplexes auch in höheren Organismen abhängig vom Vorhandensein von H2A.Z ist.

Es ist angesichts des drastischen Effekts auf MYC-Zielgene überraschend, daß eine Herunterregulation der Expression von *MED24* in U2OS-Zellen kein verändertes Verhalten der Zellen beim MycER-vermittelten Eintritt in die S-Phase hervorruft [59]. Wie hier beobachtet wurde, zeigen NIH3T3-Zellen bei Herunterregulation der Expression von *med24* dasselbe Verhalten (s. Abb. 3.19 auf Seite 82); desweiteren waren keinerlei Veränderungen der Zellmorphologie durch Expression von shRNA-Sequenzen gegen *med24* und *cdk8* feststellbar. Da die Aktivierung von MycER jedoch unverändert den Eintritt in den Zellzyklus auslösen kann, muß diese biologische Funktion von MYC unabhängig von der Interaktion mit dem Mediator-Komplex sein. Dominguez-Sola und Kollegen konnten zeigen, daß MYC in Mensch- und Mauszellen sowie in kernfreien Extrakten aus *Xenopus*-Zellen die Initiation der DNA-Replikation über einen nichttranskriptionellen Weg auslösen kann [114], was die hier beobachteten Effekte erklären könnte.

Liu und Kollegen zeigten in HeLa-Zellen eine Rekrutierung des Mediator-Komplexes an c-MYC am *TERT* (Telomerase reverse Transkriptase)-Promotor, welche abhängig von der STAF65 γ (SPTF-assoziiierter Faktor 65 γ)-Untereinheit des STAGA-Komplexes (Spt3-TAF_{II}31-Gcn5L-Acetylase) war, welcher ebenfalls von MYC an den Promotor rekrutiert wurde. Die Rekrutierung von MED12 und MED13, d.h. des fakultativen repressorischen Moduls des Mediator-Komplexes, war am ebenfalls MYC-regulierten *GAPDH* (Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-Promotor zu beobachten, am Promotor von *TERT* jedoch nur sehr schwach, was auf eine unterschiedliche Regulation von MYC-Zielgenen durch das CDK8-Modul hindeutet. MED1 und MED17 waren nach STAF65 γ -Depletion nicht mehr an den *TERT*-Promotor gebunden, hinge-

gen schon an den *GAPDH*-Promotor [113]. Dies könnte bedeuten, daß die STAGA-vermittelte Rekrutierung des Mediator-Komplexes nur auf manchen MYC-regulierten Promotoren stattfindet. Die hier betrachteten *CCND2*- und *NCL*-Promotoren zeigen eine MYC-abhängige Rekrutierung von MED1 und auch von CDK8.

Desweiteren ließen sich Untereinheiten des Mediator-Komplexes nach STAF65 γ -Depletion nicht mehr oder deutlich schwächer mit einem GST(Glutathion-S-Transferase)-gekoppelten N-terminalen Fragment von c-MYC präzipitieren; MED12 und MED13 ließen sich auch vor Depletion nicht oder nur sehr schwach präzipitieren, was bedeuten könnte, daß das CDK8-Modul bevorzugt bei der Bindung an DNA mit dem rekrutierten Komplex assoziiert. Außerdem wurde beobachtet, daß das Wachstum von HeLa-, allerdings nicht von U2OS-Zellen abhängig vom Vorhandensein von STAF65 γ ist, wobei die Expression von aktivierten MYC-Zielgenen in HeLa-Zellen unter Einfluß der shRNA gegen *STAF65 γ* sank [113]. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Sandra Bernard bezüglich der shRNA-vermittelten Depletion von MED24 in HeLa-Zellen überein. Die Auswirkungen der Depletion von STAF65 γ könnte Aufschluß über die hypothetisch unterschiedliche STAGA- und Mediator-vermittelte Regulation von c-MYC-Zielgenen in c-MYC-abhängigen und von c-MYC unabhängigen Zellen geben.

A Literaturverzeichnis

1. R. D. Kornberg und Y. Lorch. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3):285–94, 1999.
2. S. I. S. Grewal und S. Jia. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*, 8:35–46, 2007.
3. P. J. Horn und C. L. Peterson. Heterochromatin assembly: A new twist on an old model. *Chromosome Res*, 14:83–94, 2006.
4. K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent und T. J. Richmond. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648):251–60, 1997.
5. J. Ausio. Histone variants—the structure behind the function. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5(3):228–43, 2006.
6. C. L. Peterson und M.-A. Laniel. Histones and histone modifications. *Curr Biol*, 14(14):R546–51, 2004.
7. O. J. Rando. Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet*, 23(2):67–73, 2007.
8. R. T. Kamakaka und S. Biggins. Histone variants: deviants? *Genes Dev*, 19:295–316, 2005.
9. R.-H. Pusarla und P. Bhargava. Histones in functional diversification – Core histone variants. *FEBS J*, pages 5149–68, 2005.
10. J. Zlatanova und A. Thakar. H2A.Z: View from the top. *Structure*, 16:166–79, 2008.
11. R. M. Raisner und H. D. Madhani. Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev*, 16(2):119–24, 2006.
12. T. Kusch, L. Florens, W. H. Macdonald, S. K. Swanson, R. L. Glaser, J. R. Yates III, S. M. Abmayr, M. P. Washburn und J. L. Workman. Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science*, 306(5704):2084–7, 2004.
13. B. Guillemette und L. Gaudreau. Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochem Cell Biol*, 84(4):528–35, 2006.
14. R. Faast, V. Thonglairoam, T. C. Schulz, J. Beall, J. R. Wells, H. Taylor, K. Matthaei, P. D. Rathjen, D. J. Tremethick und I. Lyons. Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol*, 11(15):1183–7, 2001.
15. S. Hua, C. B. Kallen, R. Dhar, M. T. Baquero, C. E. Mason, B. A. Russell, P. K. Shah, J. Liu, A. Khramtsov, M. S. Tretiakova, T. N. Krausz, O. I. Olopade, D. L. Rimm und K. P. White. Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone

- variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Mol Syst Biol*, 4(188), 2008.
16. J. Jin, Y. Cai, B. Li, R. C. Conaway, J. L. Workman, J. W. Conaway und T. Kusch. In and out: histone variant exchange in chromatin. *TIBS*, 30(12):680–7, 2005.
 17. D. D. Ruhl, J. Jin, Y. Cai, S. Swanson, L. Florens, M. P. Washburn, R. C. Conaway, J. W. Conaway und J. C. Chrivia. Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry*, 45(17):5671–77, 2006.
 18. A. Barski, S. Cuddapah, K. Cui, T.-Y. Roh, D. E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev und K. Zhao. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4):823–37, 2007.
 19. K. Lemieux, M. Laroche und L. Gaudreau. Variant histone H2A.Z, but not the HMG proteins Nhp6a/b, is essential for the recruitment of Swi/Snf, Mediator, and SAGA to the yeast GAL1 UAS(G). *Biochem Biophys Res Commun*, 2008.
 20. B. D. Strahl und C. D. Allis. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765):41–5, 2000.
 21. T. Jenuwein und C. D. Allis. Translating the histone code. *Science*, 293(5532):1074–80, 2001.
 22. B. T. Seet, I. Dikic, M. M. Zhou und T. Pawson. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7):473–83, 2006.
 23. Y. Doyon und J. Côté. The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev*, 14(2):147–54, 2004.
 24. J.-F. Couture und R. C. Trievel. Histone-modifying enzymes: encrypting an enigmatic epigenetic code. *Curr Opin Struct Biol*, 16(6):753–60, 2006.
 25. M. Squatrito, C. Gorrini und B. Amati. Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol*, 16(9):433–42, 2006.
 26. V. Sapountzi, I. R. Logan und C. N. Robson. Cellular functions of TIP60. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(9):1496–509, 2006.
 27. S. Adhikary und M. Eilers. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8):635–45, 2005.
 28. F. H. C. Crick. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*, 12:138–63, 1958.
 29. H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, Matsudaira. P., D. Baltimore und J. E. Darnell. *Molecular cell biology*. W. H. Freeman and Co., New York, 4th ed. 1999.
 30. J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Co., New York, 5th. ed. 2002.
 31. M. C. Thomas und C.-M. Chiang. The General Transcription Machinery and General Cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 41:105–78, 2006.
 32. Roger D. Kornberg. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(32):12955–61, 2007.
 33. R. G. Roeder. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *TIBS*, 21(9):327–35, 1996.

34. S. Malik und R. G. Roeder. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *TIBS*, 30(5):256–63, 2005.
35. R. C. Conaway, S. Sato, C. Tomomori-Sato, T. Yao und J. W. Conaway. The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *TIBS*, 30(5):250–5, 2005.
36. H. Elmlund, V. Baraznenok, M. Lindahl, C. O. Samuelson, P. J. Koeck, S. Holmberg, H. Hebert und C. M. Gustafsson. The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *PNAS*, 103(43):15788–93, 2006.
37. X. Zhu, M. Wirén, I. Sinha, N. N. Rasmussen, T. Linder, S. Holmberg, K. Ekwall und C. M. Gustafsson. Genom-Wide Occupancy Profile of Mediator and the Srb8-11 Module Reveals Interactions with Coding Regions. *Mol Cell*, 22(2):169–78, 2006.
38. J. C. Andrau, L. van de Pasch, P. Lijnzaad, T. Bijma, M. G. Koerkamp, J. van de Peppel, M. Werner und F. C. P. Holstege. Genome-wide location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Mol Cell*, 22(2):179–92, 2006.
39. T. Furumoto, A. Tanaka, M. Ito, S. Malik, Y. Hirose, F. Hanaoka und Y. Ohkuma. A kinase subunit of the human mediator complex, CDK8, positively regulates transcriptional activation. *Genes Cells*, 12(1):119–32, 2007.
40. A. J. Donner, S. Szostek, J. M. Hoover und J. M. Espinosa. CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. *Mol Cell*, 27(1):121–33, 2007.
41. B. Vennstrom, D. Sheiness, J. Zabielski und J. M. Bishop. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol.*, 42(3):773–79, 1982.
42. A. C. Davis, M. Wims, G. D. Spotts, S. R. Hann und A. Bradley. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev*, 7(4):671–82, 1993.
43. N. C. Dubois, C. Adolphe, A. Ehninger, R. A. Wang, E. J. Robertson und A. Trumpp. Placental rescue reveals a sole requirement for c-Myc in embryonic erythroblast survival and hematopoietic stem cell function. *Development*, 135(14):2455–65, 2008.
44. T. K. Blackwell, J. Huang, A. Ma, L. Kretzner, F. W. Alt, R. N. Eisenman und H. Weintraub. Binding of Myc Proteins to Canonical und Noncanonical DNA Sequences. *Mol Cell Biol*, 13(9):5216–24, 1993.
45. E. Guccione, F. Martinato, G. Finocchiaro, L. Luzi, L. Tizzoni, V. Dall’Olio, G. Zardo, C. Nervi, L. Bernard und B. Amati. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol*, 8(7):764–70, 2006.
46. P. J. Greasley, C. Bonnard und B. Amati. Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res*, 28(2):446–53, 2000.
47. P. Staller, K. Peukert, A. Kiermaier, J. Seoane, J. Lukas, H. Karsunky, T. Möröy, J. Bartek, J. Massagué, F. Hänel und M. Eilers. Repression of p15INK4B

- expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol*, 3(4):392–9, 2001.
48. S. Adhikary, K. Peukert, H. Karsunky, V. Beuger, W. Lutz, H.-P. Elsässer, T. Möröy und M. Eilers. Miz1 is required for Early Embryonic Development during Gastrulation. *Mol Cell Biol*, 23(21):7648–57, 2003.
 49. T. Oskarsson und A. Trumpp. The Myc trilogy: lord of RNA polymerases. *Nat Cell Biol*, 7(3):215–7, 2005.
 50. M. Eilers, D. Picard, K. R. Yamamoto und J. M. Bishop. Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature*, 340(6228):66–8, 1989.
 51. T. D. Littlewood, D. C. Hancock, P. S. Danielian, M. G. Parker und G. I. Evan. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res*, 23(10):1686–909, 1995.
 52. C. Bouchard, J. Marquardt, A. Brás, R. H. Medema und M. Eilers. Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J*, 23(14):2830–40, 2004.
 53. S. Bernard. Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch c-Myc, Dissertation, Universität Marburg 2008.
 54. C. Rachez, Z. Suldán, J. Ward, C. P. Chang, D. Burakov, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst und L. P. Freedman. A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev*, 12(12):1787–1800, 1998.
 55. J. Zhang und J. D. Fondell. Identification of mouse TRAP100: a transcriptional coregulatory factor for thyroid hormone and vitamin D receptors. *Mol Endocrinol*, 13(7):1130–40, 1998.
 56. M. Ito, H. J. Okano, R. B. Darnell, und R. G. Roeder. The TRAP100 component of the TRAP/Mediator complex is essential in broad transcriptional events and development. *EMBO J*, 21(13):3464–75, 2002.
 57. K. Dürr, J. Holzschuh, A. Filippi, A. K. Ettl, S. Ryu, I. T. Sheperd und W. Driever. Differential roles of transcriptional mediator complex subunits Crsp34/Med27, Crsp150/Med14 and Trap100/Med24 during zebrafish retinal development. *Genetics*, 174(2):693–705, 2006.
 58. J. Pietsch, J. M. Delalande, B. Jakaitis, J. D. Stensby, S. Dohle, W. S. Talbot, D. W. Raible und I. T. Sheperd. *lessen* encodes a zebrafish trap100 required for enteric nervous system development. *Development*, 133(3):395–406, 2006.
 59. D. Maaß. Die biologische Relevanz der Interaktion zwischen c-MYC und dem Mediator-Komplex via MED24, Diplomarbeit, Universität Marburg 2007.
 60. K. Peukert, P. Staller, A. Schneider, G. Carmichael, F. Hänel und M. Eilers. An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J*, 16(18):5672–86, 1997.
 61. J. Ziegelbauer, B. Shan, D. Yager, C. Larabell, B. Hoffmann und R. Tjian. Transcription Factor MIZ-1 is Regulated via Microtubule Association. *Mol Cell*, 8(2):339–49, 2001.

62. M. Wanzel, D. Kleine-Kohlbrecher, S. Herold, A. Hock, K. Berns, J. Park, B. Hemmings und M. Eilers. Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damaga. *Nat Cell Biol*, 7(1):30–41, 2005.
63. J. H. Patel und S. B. McMahon. Targeting of Miz-1 Is Essential for Myc-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 281(6):3283–9, 2005.
64. J. H. Patel und S. B. McMahon. BCL2 Is a Downstream Effector of MIZ-1 Essential for Blocking c-MYC-induced Apoptosis. *J Biol Chem*, 282(1):5–13, 2007.
65. J.-P. Reese. Identifizierung von *bona fide* Interaktionspartnern der Transkriptionsfaktoren c-MYC und MIZ-1, Dissertation, Universität Marburg 2008.
66. M. P. Washburn, D. Wolters und J. R. Yates III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 19(3):242–7, 2001.
67. J. Sambrook und D. W. Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
68. G. I. Evan, G. K. Lewis, G. Ramsay und J. M Bishop. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*, 5(12):445–51, 1985.
69. Thijn R. Brummelkamp, René Bernards und Reuven Agami. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296(5567):550–53, 2002.
70. Q. Feng und Y. Zhang. The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev*, 15(7):827–32, 2001.
71. T. M. Kinsella und G. P. Nolan. Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther*, 7(12):1405–13, 1996.
72. R. Beier, A. Bürgin, A. Kiermaier, M. Fero, H. Karsunky, R. Saffrich, T. Möröy, W. Ansorge, J. Roberts und M. Eilers. Induction of cyclin E–cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. *EMBO J.*, 19(21):5813–23, 2000.
73. M. K. Mateyak, A. J. Obaya, S. Adachi und J. M. Sedivy. Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ*, 8(10):1039–48, 1997.
74. Wayne Davis. ApE - A plasmid editor, 2003.
75. Roche Diagnostics GmbH, <http://www.universalprobelibrary.com>.
76. Steve Rozen und Helen J. Skaletsky. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.*, 2000.
77. M. Lexa, J. Horak und B. Brzobohaty. Virtual PCR. *Bioinformatics*, 17:192–3, 2001.

78. W.J. Kent, C. W. Sugnet, T. S. Furey, K.M. Roskin, T. H. Pringle, A. M. Zahler und D. Haussler. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res*, 12(6):996–1006, 2002.
79. Geospiza Inc., <http://www.geospiza.com/finchttv/>.
80. J.D. Thompson, D.G. Higgins und T.J. Gibson. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22:4673–4680, 1994.
81. S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers und D.J. Lipman. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215:403–10, 1990.
82. S. McGinnis und T.L. Madden. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 32:W20–5, 2004.
83. NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
84. E. Birney, T. D. Andrews, P. Bevan, M. Caccamo, Y. Chen, L. Clarke, G. Coates, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, T. Down, E. Eyra, X. M. Fernandez-Suarez, P. Gane, B. Gibbins, J. Gilbert, M. Hammond, H. R. Hotz, V. Iyer, K. Jekosch, A. Kahari, A. Kasprzyk, D. Keefe, S. Keenan, H. Lehvaslaiho, G. McVicker, C. Melsopp, P. Meidl, E. Mongin, R. Pettett, S. Potter, G. Proctor, M. Rae, S. Searle, G. Slater, D. Smedley, J. Smith, W. Spooner, A. Stabenau, J. Stalker, R. Storey, A. Ureta-Vidal, K. C. Woodwark, G. Cameron, R. Durbin, A. Cox, T. Hubbard und M. Clamp. An overview of Ensembl. *Genome Res*, 14(5):925–8, 2004.
85. J. D. Dignam, R. M. Lebovitz und R. G. Roeder. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 11(5):1475–89, 1983.
86. U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
87. T. Ahn, S. K. Yim, H. I. Choi und C. H. Yun. Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes. *Anal Biochem*, 291(2):300–303, 2001.
88. C. Aaij und P. Borst. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*, 269(2):192–200, 1972.
89. H. Kuhn, V. V. Demidov und M. D. Frank-Kamenetskii. Rolling-circle amplification under topological constraints. *Nucleic Acids Res*, 30(2):574–80, 2002.
90. M. W. Pfaffl. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*, 2004.
91. H. B. Koch, R. Zhang, B. Verdoodt, C. D. Zhang, J. R. Yates III, A. Menssen und H. Hermeking. Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle*, 6(2):205–17, 2007.
92. B. E. Lavan, V. R. Fantin, E. T. Chang, W. S. Lane, S. R. Keller und G. E. Lienhard. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem*, 272(34), 1997.

93. V. R. Fantin, J. D. Sparling, J. W. Slot, S. R. Keller, G. E. Lienhard und B. E. Lavan. Characterization of Insulin Receptor Substrate 4 in Human Embryonic Kidney 293 Cells. *J Biol Chem*, 273(17):10726–32, 1998.
94. C. Bouchard, O. Dittrich, A. Kiermaier, K. Dohmann, A. Menkel, M. Eilers und B. Lüscher. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev*, 15(16):2042–7, 2001.
95. S. Schreiner, M. Birke, M.-P. García-Cuéllar, O. Zilles, J. Greil und R. K. Slany. MLL-ENL Causes a Reversible and myc-dependent Block of Myelomonocytic Cell Differentiation. *Cancer Res*, 61(17):6480–6, 2001.
96. S. A. Denslow und P. A. Wade. The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene*, 26(37):5433–8, 2007.
97. C. M. Taniguchi, B. Emanuelli und C. R. Kahn. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(2):85–96, 2006.
98. J. Chen, A. Wu, H. Sun, R. Drakas, C. Garofalo, C. Cascio, E. Surmacz und R. Baserga. Functional Significance of Type 1 Insulin-like Growth Factor-mediated Nuclear Translocation of the Insulin Receptor Substrate-1 and beta-Catenin. *J Biol Chem*, 280(33):29912–20, 2005.
99. A. Wu, J. Chen und R. Baserga. Nuclear insulin receptor substrate-1 activates promoters of cell cycle progression genes. *Oncogene*, 27(397–403), 2008.
100. E. P. Cuevas, O. Escribano, A. Chiloeches, S. Ramirez Rubio, I. D. Román, M. D. Fernández-Moreno und L. G. Guijarro. Role of insulin receptor substrate-4 in IGF-I-stimulated HEPG2 proliferation. *J Hepatol*, 46(6):1089–98, 2007.
101. H. Sano, S. H. C. Liu, W. S. Lane, J. E. Piletz und G. E. Lienhard. Insulin Receptor Substrate 4 Associates with the Protein IRAS. *J Biol Chem*, 277(22):19439–47, 2002.
102. A. Hermeking, H. und Benzinger. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol*, 16(3):183–92, 2006.
103. R. Böhni, J. Riego-Escovar, S. Oldham, W. Brogiolo, R. Stocker, B. F. Andrus, K. Beckingham und E. Hafen. Autonomous Control of Cell and Organ Size by CHICO, a Drosophila Homolog of Vertebrate IRS1–4. *Cell*, 97(7):865–75, 1999.
104. L. A. Johnston, D. A. Prober, B. A. Edgar, R. N. Eisenman und P. Gallant. Drosophila myc Regulates Cellular Growth during Development. *Cell*, 98(6):779–90, 1999.
105. W. Zhong, S. Mao, S. Tobis, E. Angelis, M. C. Jordan, K. P. Roos, M. C. Fishbein, I. M. de Alborán und W. R. MacLellan. Hypertrophic growth in cardiac myocytes is mediated by Myc through a Cyclin D2-dependent pathway. *EMBO J*, 25(16):3869–79, 2006.
106. N. Gevry, H. M. Chan, L. Laflamme, D. M. Livingston und L. Gaudreau. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev*, 21(15):1869–81, 2007.
107. S. John, P. J. Sabo, T. A. Johnson, M.-H. Sung, S. C. Biddie, S. L. Lightman, T. C. Voss, S. R. Davis, P. S. Meltzer, J. A. Stamatoyannopoulos und G. L. Hager.

- Interaction of the Glucocorticoid Receptor with the Chromatin Landscape. *Mol Cell*, 29(5):611–24, 2008.
108. S. D. Farris, E. D. Rubio, J. J. Moon, W. M. Gombert, B. H. Nelson und A. Krumm. Transcription-induced chromatin remodeling at the c-myc gene involves the local exchange of histone H2A.Z. *J Biol Chem*, 280(26):25298–25303, 2005.
109. S. E. Updike, D. L. und Mango. Temporal Regulation of Foregut Development by HTZ-1/H2A.Z and PHA-4/FoxA. *PLoS Genet*, 2(9):e161, 2006.
110. R. B. Deal, C. N. Topp, E. C. McKinney und R. B. Meagher. Repression of flowering in Arabidopsis requires activation of FLOWERING LOCUS C expression by the histone variant H2A.Z. *Plant Cell*, 19(1):74–83, 2007.
111. G. Xiao, S. Mao, G. Baumgarten, J. Serrano, M. C. Jordan, K. P. Roos, M. C. Fishbein und W. R. MacLellan. Inducible Activation of c-Myc in Adult Myocardium In Vivo Provokes Cardiac Myocyte Hypertrophy and Reactivation of DNA Synthesis. *Circ Res*, 89(12):1122–9, 2001.
112. I.-Y. Chen, J. Lypowy, J. Pain, D. Sayed, S. Grinberg, R. R. Alcendor, J. Sadoshima und M. Abdellatif. Histone H2A.z is essential for cardiac myocyte hypertrophy but opposed by silent information regulator 2alpha. *J Biol Chem*, 281(28):19369–77, 2006.
113. X. Liu, M. Vorontchikhina, Y. L. Wang, F. Faiola und E. Martinez. STAGA recruits Mediator to the MYC oncoprotein to stimulate transcription and cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 28(1):108–21, 2008.
114. D. Dominguez-Sola, C. Y. Ying, C. Grandori, L. Ruggiero, B. Chen, M. Li, D. A. Galloway, W. Gu, J. Gautier und R. Dalla-Favera. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*, 448(7152):445–51, 2007.
115. D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy und J. S. Cottrell. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18):3551–67, 1999.

B Abkürzungsverzeichnis

B.1 Präfixe

Abkürzung	Vorsilbe	Faktor
p	Pico-	10^{-12}
n	Nano-	10^{-9}
μ	Mikro-	10^{-6}
m	Milli-	10^{-3}
c	Centi-	10^{-2}
k	Kilo-	10^3

B.2 Einheiten

A Ampere

Å Ångström

Da Dalton

g Gramm

J Joule

l Liter

m Meter

M mol/l

mol Mol

s Sekunde

U Unit

V Volt

W Watt

°C Grad Celsius

B.3 Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin	x		variable AS
M	Met	Methionin	Ψ		beliebige hydrophobe AS

B.4 Organismen, Proteine, Proteindomänen und andere Biomoleküle

A Adenin

Ada Adapter

Ada2 Adapter 2

AF9 ALL1-fusioniertes Gen (Chromosom 9)

AK Antikörper

ALL1 Akute lymphatische Leukämie 1

AMP Adenosinmonophosphat

APEX1 apurinische/apyrimidinische Endonuklease 1

Arp aktinverwandtes Protein, *actin-related protein*

AS Aminosäure

ATM Ataxia telangiectasia-mutiert

ATP Adenosin-5'-triphosphat

bp Basenpaar(e)

BSA Rinder-Serumalbumin, *bovine serum albumin*

BTB Broad-complex, Tramtrack und Bric-a-brac

C Cytosin

cAMP cyclo-AMP, zyklisches Adenosinmonophosphat

CBP CREB-bindendes Protein

CCKBR Cholecystokinin B-Rezeptor

CCND1 Zyklin D1, *cyclin D1*

CCND2	Zyklin D2, <i>cyclin D2</i>
CDC28	Zellteilungskontrollprotein 28, <i>cell division control protein 28</i>
CDK	cyclinabhängige Kinase, <i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
C/EBPα	CCAAT/Enhancer-bindendes Protein α
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHD4	Chromodomänen–Helikase–DNA-bindendes Protein 4
Chz1	Chaperon für H2A.Z-H2B
CIP1	CDK-interagierendes Protein 1
CKS2	CDC28-Proteinkinase, regulatorische Untereinheit 2
CoA	Coenzym A
CREB	cAMP-Antwort-Element–bindendes Protein, <i>cAMP response element binding protein</i>
CREBBP	CREB-bindendes Protein
CTCF	CCCTC-bindender Faktor
CTD	carboxyterminale Domäne
DDX18	DEAD-Box Polypeptid 18
DEAD	Asparaginsäure-Glutaminsäure-Alanin-Asparaginsäure
DHFR	Dihydrofolatreduktase
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dMyc	<i>Drosophila Myc</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEF1A1	Eukaryotischer Translationselongationsfaktor 1 α 1
ENL	<i>eleven nineteen leukemia</i>
EPHX1	Epoxidhydrolase 1, mikrosomal (xenobiotisch)
ERK	extrazelluläre Signale-regulierte Kinase
Esa1	essentielle Sas2-verwandte Acetyltransferase 1
E2F	Transkriptionsfaktor des Adenovirus–E2-Promotors
FASN	Fettsäuresynthase, <i>fatty acid synthase</i>
FAT	FRAP-ATM-TRRAP
FGR	Gardner-Rasheed felines Sarkom
FKBP12	FK506-bindendes Protein, 12 kDa
FLC	<i>flowering locus C</i>
FRAP	FKBP12-Rapamycin–Komplex-assoziiertes Protein

FYN	FGR/YES-verwandtes neues Gen
G	Guanin
GAL1	Galaktokinase 1
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat–Dehydrogenase
GAS41	Gliom-amplifiziertes Protein 41
GDP	Guanosin-5´-diphosphat
GNAT	Gcn5-verwandte N-Acetyltransferase
GOLPH3	Golgi-Phosphoprotein 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
Grb2	Wachstumsfaktor-Rezeptor-bindendes Protein 2, <i>growth factor receptor binding protein 2</i>
HA	Hämagglutinin
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HMT	Histonmethyltransferase
HRP	Meerrettich-Peroxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
<i>H.sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HS6ST2	Heparansulfat-6-O-Sulfotransferase 2
IgG	Immunglobulin G
INK4	Inhibitor von CDK4
Inr	Initiator
IRAS	Imidazolinrezeptor-Antisera-selektiert
IRS4	Insulinrezeptorsubstrat 4
ISWib	<i>imitation switch b</i>
ITM2A	Integrales Membranprotein 2A
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MAX	Myc-assoziiertes Faktor X
MBD3	Methyl-CpG-bindende Domäne–Protein 3
MCM7	<i>minichromosome maintenance 7</i>
MID	MYC-interagierende Domäne
MINA53	MYC-induziertes nukleäres Antigen 53
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>

MOZ	Monozytische Leukämie-Zinkfingerprotein
mRNA	Boten-RNA, <i>messenger</i> RNA
mtRNAP	mitochondriale RNA-Polymerase
MYC	Myelocytomatose-Onkogen
MYST	MOZ-Ybf2/Sas3-Sas2-Tip60
NAP-1	Nukleosom-Aufbau-Protein 1, <i>nucleosome assembly protein 1</i>
NAP1L1	Nukleosom-Aufbau-Protein 1-ähnlich 1, <i>nucleosome assembly protein 1-like 1</i>
NBS1	Nijmegen-Bruchsyndrom 1
NCL	Nukleolin, <i>nucleolin</i>
NCoR	Nukleärer Korepressor, <i>nuclear corepressor</i>
NFκB	Nukleärer Faktor κ B
NLS	Kernlokalisationssignal, <i>nuclear localization signal</i>
NPM1	Nukleosphosmin 1
nt	Nukleotid(e)
NuA4	Nukleosom-Acetyltransferase von H4
NuRD	<i>nucleosome remodeling and histone deacetylation</i>
ODC	Ornithindecaboxylase
PCAF	P300/CBP-assoziiertes Faktor
PHD	Pflanzen-Homeobox-Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIC	Präinitiationskomplex, <i>preinitiation complex</i>
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
Pol.	Polymerase
POZ	Pockenvirus und Zinkfinger
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor, γ -Isoform
PREP	Prolylendopeptidase
PSMB1	Proteasom(Prosom, Macropain)-Untereinheit β -Typ 1
P-TEFb	positiver Transkriptionselongationsfaktor b
PTMA	Prothymosin α
Pxxx	Protein mit xxx kDa
RAS	Rattensarkom
RBBP4	Retinoblastoma-bindendes Protein 4
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
<i>R.norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>

RNAPII	RNA-Polymerase II
rRNA	ribosomale RNA
RSC	<i>remodel the structure of chromatin</i>
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
SANT	Swi3-Ada2-NCoR-TFIIB
Sas	<i>something about silencing</i>
SH2	Src-Homologie-Region 2
SHMT1	Serin-Hydroxymethyltransferase 1
SHP2	SH2-enhaltende Tyrosinphosphatase 2
Sp	Spezifitätsprotein
Spt	Suppressor von Ty
SPTF	Sp-verwandter Transkriptionsfaktor
SRCAP	Snf2-verwandtes CREBBP-Aktivatorprotein, <i>Snf2-related CREBBP activator protein</i>
STAF65_γ	SPTF-assoziiertes Faktor 65 _γ
STAGA	Spt3-TAF _{II} 31-Gcn5L-Acetylase
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SURF6	Übermaß 6, <i>surfeit 6</i>
Swi3	<i>switching deficient 3</i>
SWI/SNF	<i>switching deficient / sucrose nonfermentable</i>
Swr1	Swi2-ATPase-Domäne-verwandt 1; Swi2 ATPase <i>domain-related-1</i>
T	Thymin
TA	Transkriptionsaktivierung
TAF	TBP-assoziiertes Faktor
TBP	TATA-bindendes Protein
TERT	Telomerase-reverse Transkriptase
TFIIA	Transkriptionsfaktor A der RNA-Polymerase II
TFIIB	Transkriptionsfaktor B der RNA-Polymerase II
TFIID	Transkriptionsfaktor D der RNA-Polymerase II
TFIIE	Transkriptionsfaktor E der RNA-Polymerase II
TFIIF	Transkriptionsfaktor F der RNA-Polymerase II
TFIIH	Transkriptionsfaktor H der RNA-Polymerase II
TIP60	Tat-interagierendes Protein, 60 kDa
TR	Thyroidhormonrezeptor
tRNA	Transfer-RNA
TRRAP	transformations-/transkriptionsdomänenassoziiertes Protein

UAS stromaufwärts gelegene aktivierende Sequenz, *upstream activating sequence*
VDR Vitamin D-Rezeptor
VP16 Virales Protein 16 des *Herpes simplex*-Virus
YEATS YNK7-ENL-AF9-TFIIF *small subunit*
YES Yamaguchi-Sarkom
YNK7 Nukleosiddiphosphatkinase 7 aus Hefe, *yeast nucleoside diphosphate kinase*
7
WTAP Wilms-Tumor-assoziiertes Protein

B.5 Lösungen und Chemikalien

4-OHT 4-Hydroxytamoxifen
APS Ammoniumpersulfat
ATP Adenosintriphosphat
ddH₂O doppelt destilliertes Wasser
DMEM Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO Dimethylsulfoxid
DSG Disuccinimidylglutarat
DTT Dithiothreitol
EDTA Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGTA Ethylenglykol-N,N,N',N'-tetraacetat
FCS Fötales Kälberserum, *fetal calf serum*
FITC Fluoresceinisothiocyanat
NCS Serum neugeborener Kälber, *newborn calf serum*
PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung, *phosphate-buffered saline*
PEI Polyethylenimid
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF Polyvinylidenfluorid
SDS Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecyl sulfate*
TBE Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS Tris-gepufferte Salzlösung, *Tris-buffered saline*
TBS-T mit Tween-20 versetzte Tris-gepufferte Salzlösung
TE Tris-EDTA-Puffer
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

B.6 Andere Abkürzungen

2D zweidimensional(e)

Abb. Abbildung

abs. absolut

AG Aktiengesellschaft oder Arbeitsgruppe

Akt. Aktivierung

ATCC American Type Culture Collection

A.thaliana *Arabidopsis thaliana*

bzw. beziehungsweise

c- zellulär, *cellular*

ca. *circa*

ChIP Chromatinimmunpräzipitation

CMV Cytomegalievirus

Corp. *Corporation*

Cxxxx Chromatographie-Puffer mit xxxx mM NaCl

d. h. das heißt

ECL verbesserte Chemolumineszenz, *enhanced chemoluminescence*

ed. Auflage, *edition*

ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*

et al. und andere, *et alii*

Fa. Firma

FACS *fluorescence-activated cell sorting*

g 9,81 ms⁻²; Erdbeschleunigung

ggf. gegebenenfalls

HEK humane embryonale Nierenzellen; *human embryonic kidney*

HPLC Hockdruck-Flüssigchromatographie, *high pressure liquid chromatography*

i. d. R. in der Regel

IP Immunpräzipitation

KoIP Koimmunpräzipitation

MALDI-TOF *matrix-assisted laser desorption-ionization - time of flight*

min Minute(n)

MudPIT Multidimensionale Proteinidentifikationstechnologie

NCBI *National Center for Biotechnology Information* (USA)

NIH *National Institutes of Health* (USA)

NKI Niederländisches Krebsinstitut

Nr. Nummer

OD Optische Dichte

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCA Phosphozellulose-Fraktion A; *phosphocellulose fraction A*

PCB Phosphozellulose-Fraktion B; *phosphocellulose fraction B*

PCC Phosphozellulose-Fraktion C; *phosphocellulose fraction C*

PCD Phosphozellulose-Fraktion D; *phosphocellulose fraction D*

PCR Polymerase-Kettenreaktion, *polymerase chain reaction*

qPCR quantitative PCR

Repr. Repression

RNAi RNA-Interferenz

rpm Umdrehungen pro Minute, *rotations per minute*

RT Raumtemperatur; 21 °C

s. siehe

S.cerevisiae *Saccharomyces cerevisiae*

SD Standardabweichung, *standard deviation*

SNP Einzelnukleotid-Polymorphismus, *single nucleotide polymorphism*

SV Säulenvolumen

Tab. Tabelle

TAP Tandem-Affinitätsreinigung, *tandem affinity purification*

u.a. unter anderem

ÜN über Nacht; 12–20 h

usw. und so weiter

UV ultraviolett

UV-B Ultraviolettstrahlung, $280\text{ nm} \leq \lambda \leq 320\text{ nm}$

u. U. unter Umständen

v- viral

v.a. vor allem

Vol. Volumen

v/v Volumenanteil pro Volumen, *volume per volume*

wt Wildtyp

w/v Gewichtsanteil pro Volumen, *weight per volume*

z. B. zum Beispiel

ZMBH Zentrum für molekulare Biologie Heidelberg

C Ergebnislisten massenspektrometrischer Analysen

Die nachfolgenden Listen putativer Interaktoren von MIZ-1 wurden durch MudPIT-Analysen chromatographisch angereicherter Fraktionen generiert. Diese wurden von Thomas Ruppert (ZMBH, Universität Heidelberg) durchgeführt.

Die Fraktionen wurden konzentriert, einem tryptischen Verdau unterzogen und die Peptide nach einer RP(Revers-Phasen)-HPLC–Auftrennung mittels MALDI-TOF identifiziert, hierbei wurde auf das Programm Mascot [115] zurückgegriffen. Die hier aufgeführten Proteine waren aufgrund eindeutig identifizierter Peptide in den Präparationen in diesen mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95 % enthalten.

Ergebnislisten massenspektrometrischer Analysen

GenInfo-Nr.	Proteinname	Güte	m [kDa]	Peptide	Abdek- kung [%]
3122765	DNA-directed RNA polymerase III largest subunit (RPC155) (RPC1)	1142	158	24	20,8
29568103	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa isoform a	856	52	21	45,8
119609805	ubiquitin-conjugating enzyme E2O, isoform ϵ	773	143	15	15,2
49456871	TUBB	575	50	11	33,9
24429617	RNA polymerase III subunit RPC2 (7)	569	129	10	11,1
12804891	TUBB protein	558	39	12	41,8
28317	unnamed protein product	532	60	12	15,3
38014278	TUBB3 protein	468	46	9	22,2
119576010	hCG1992406, isoform α	450	51	8	23,6
14589951	DNA directed RNA polymerase II polypeptide E	434	25	9	51,9
113197968	KRT9 protein	431	48	8	24,2
8922477	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E	414	81	9	13,4
55769552	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D	388	45	7	24,9
4759156	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	381	31	8	30,9
5032027	retinoblastoma binding protein 4	377	48	7	15,3
21619816	TUBA6 protein	363	37	7	24,3
31873439	hypothetical protein	342	55	7	15,4
4759158	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide D2	332	14	7	47,5
7546344	U1A-PIE Chain A	296	12	8	76,2
14198113	POLR1C protein	292	39	6	18,9
5902102	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa	290	13	11	37
119609183	chromodomain helicase DNA binding protein 4, isoform α	274	219	5	3,6
113418935	PREDICTED: similar to zinc finger protein 316	266	127	6	6,9
40217847	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1	252	246	5	3,1
1699027	nuclear corepressor KAP-1	242	90	3	4,2
12804743	Unknown (protein for IMAGE:3543670)	214	23	5	32,3
32449796	EIF3S10 protein	190	97	4	5,5
312005	small nuclear ribonucleoprotein E (Mus musculus)	179	10	5	59,3
6010112	guanine nucleotide exchange factor, delta subunit	176	58	3	9,6
190247	snRNP polypeptide B	175	30	5	8,4
119610997	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast), isoform δ	167	181	4	4,9
4759160	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide D3	165	14	6	31,7
4505119	methyl-CpG binding domain protein 3	158	33	2	11,3
7656977	calcitonin gene-related peptide-receptor component isoform a	151	17	5	36,5
10863925	DNA directed RNA polymerase II polypeptide L	131	8	1	35,8
4504733	insulin receptor substrate 4	124	135	2	2
34531573	unnamed protein product	115	20	2	9,2
2136118	ribonucleoprotein - human (fragment)	113	12	2	19,8
4503519	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47kDa	111	38	2	8,4
6912400	general transcription factor IIIC, polypeptide 4, 90kDa	111	93	2	3,3
4507133	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	110	9	4	25
400892	Protein S100-A7 (S100 calcium-binding protein A7) (Psoriasin)	106	12	2	33,7
1931584	eIF-3 p110 subunit	100	106	2	2,1
38014092	KRT4 protein	98	36	2	7,1
21755619	unnamed protein product	93	67	2	3,8
4503523	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7	84	65	1	1,8
4758188	CDK2-associated protein 1	83	12	2	20
6005757	chromatin-specific transcription elongation factor large subunit	78	120	1	2,5
4503521	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	73	53	1	4,3
40674640	IQGAP1 protein	69	108	1	1,9
3170178	antigen NY-CO-7	68	35	1	4
10334526	WTAP protein	67	44	1	2,8
1017823	RNA polymerase II subunit	66	17	1	7,3
110002587	KRT1B protein	65	38	1	2,9
5911873	hypothetical protein	60	70	1	2,5
4504205	general transcription factor IIIC, polypeptide 2, beta 110kDa	60	102	1	3,4
12711674	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B isoform 2	56	56	2	3,8
14211889	dpy-30-like protein	55	11	1	20,2
34069	unnamed protein product	55	39	1	3,4
6808030	hypothetical protein	54	83	1	2,9
3152660	GA17 protein	54	43	1	4,8
434765	ORF	51	74	1	2,1
7706499	DNA directed RNA polymerase III polypeptide K	48	13	1	8,3
7705740	polymerase (RNA) I polypeptide D isoform 1	46	15	1	8,3

Tabelle C.1: Ergebnisse der chromatographischen Reinigung des MIZ-1-Komplexes (Fraktion I).

Ergebnislisten massenspektrometrischer Analysen

GenInfo-Nr.	Proteinname	Güte	m [kDa]	Peptide	Abdek- kung [%]
39725938	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A, 155kDa	1085	158	22	20,2
29568103	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa isoform a	965	52	26	49,2
12698013	KIAA1734 protein	507	145	11	10,2
49456871	TUBB	499	50	9	30,1
4759158	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide D2	493	14	12	55,9
12804891	TUBB protein	459	39	10	33,2
190247	snRNP polypeptide B	370	30	10	20,7
14589951	DNA directed RNA polymerase II polypeptide E	346	25	7	41,4
119618187	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide B, isoform β	323	134	7	5,8
5032027	retinoblastoma binding protein 4	307	48	6	12,5
1633231	Rna-Binding Domain Of The U1a Spliceosomal Protein U1a117	298	14	7	50
4759160	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide D3	289	14	9	47,6
5902102	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa	276	13	13	37
119576010	hCG1992406, isoform α	276	51	6	15,1
12804743	Unknown (protein for IMAGE:3543670)	266	23	6	31,8
7243197	KIAA1408 protein	266	152	6	5,2
31873439	hypothetical protein	264	55	6	11,7
4759046	RNA polymerase I subunit isoform 2	247	39	5	15,5
8922477	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E	238	81	7	8,2
4504733	insulin receptor substrate 4	236	135	4	3,8
55769552	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D	233	45	4	14,3
312005	small nuclear ribonucleoprotein E (Mus musculus)	230	10	7	59,3
7546344	U1A-PIE Chain A	223	12	7	57,4
12711674	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B isoform 2	208	56	4	9,8
21619816	TUBA6 protein	205	37	5	12,6
4507127	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	203	18	5	24,5
2463577	PRP8 protein	188	275	4	3,3
119609183	chromodomain helicase DNA binding protein 4, isoform α	187	219	3	2,5
7243239	KIAA1429 protein	185	202	4	2,2
28317	unnamed protein product	171	60	2	4,6
6010112	guanine nucleotide exchange factor, delta subunit	170	58	3	7,1
4505119	methyl-CpG binding domain protein 3	145	33	2	11,3
7656977	calcitonin gene-related peptide-receptor component isoform a	143	17	4	36,5
20521660	KIAA0788 protein	140	233	2	1,7
113418935	PREDICTED: similar to zinc finger protein 316	130	127	3	3,8
40675359	EIF3S10 protein	130	75	3	4,9
4240195	KIAA0853 protein	129	113	2	3,4
4503519	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47kDa	123	38	2	8,4
4507133	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	110	9	4	25
10863925	DNA directed RNA polymerase II polypeptide L	106	8	2	52,2
7706501	WW domain binding protein 11	105	70	2	3,1
7706499	DNA directed RNA polymerase III polypeptide K	95	13	2	21,3
34531573	unnamed protein product	86	20	1	9,2
7705740	polymerase (RNA) I polypeptide D isoform 1	83	15	2	19,5
5901928	cleavage and polyadenylation specific factor 6, 68 kD subunit	82	59	1	4,5
6912400	general transcription factor IIIC, polypeptide 4, 90kDa	76	93	1	2,3
110002587	KRT1B protein	72	38	1	2,9
4503521	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	70	53	1	4,3
113197968	KRT9 protein	65	48	1	1,9
40674640	IQGAP1 protein	65	108	1	1,9
4758188	CDK2-associated protein 1	65	12	1	11,3
14211889	dpy-30-like protein	64	11	1	20,2
6005757	chromatin-specific transcription elongation factor large subunit	60	120	1	2,5
4503523	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7	58	65	1	3,6
2833636	Transcription factor (TFIIIC) alpha chain, (3' partial)	56	9	1	24,3
10334526	WTAP protein	51	44	1	2,8
51095055	similar to Heat-Shock Cognate 70kd Protein	51	26	1	5,2
17861384	nesprin-2 gamma	50	380	2	0,5
5031957	polyglutamine binding protein 1 isoform 1	49	31	1	3,4
10434431	unnamed protein product	48	28	1	4,1
434765	ORF	46	74	1	2,1
119628939	hCG2042156	46	14	1	5,3

Tabelle C.2: Ergebnisse der chromatographischen Reinigung des MIZ-1-Komplexes (Fraktion II).

Ergebnislisten massenspektrometrischer Analysen

GenInfo-Nr.	Proteinname	Güte	m [kDa]	Peptide	Abdek- kung [%]
29568103	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa isoform a	960	52	26	49,2
3122765	DNA-directed RNA polymerase III largest subunit (RPC155) (RPC1)	567	158	10	10,8
12698013	KIAA1734 protein	510	145	11	8,1
49456871	TUBB	488	50	9	27,9
119576010	hCG1992406, isoform α	468	51	10	27,3
7243239	KIAA1429 protein	453	202	8	6,1
12804891	TUBB protein	437	39	8	30,3
4759158	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide D2	415	14	12	55,9
4759156	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	372	31	8	30,9
5032027	retinoblastoma binding protein 4	363	48	7	14,1
31873439	hypothetical protein	355	55	9	19
21619816	TUBA6 protein	354	37	8	24,3
119591778	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1, isoform α	348	245	6	4
190247	snRNP polypeptide B	319	30	9	20,7
7546344	U1A-PIE Chain A	309	12	8	76,2
28317	unnamed protein product	300	60	5	9,3
4759046	RNA polymerase I subunit isoform 2	290	39	6	20,8
12804743	Unknown (protein for IMAGE:3543670)	284	23	7	40,9
4759160	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide D3	265	14	11	47,6
5902102	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa	257	13	11	37
312005	small nuclear ribonucleoprotein E (Mus musculus)	231	10	8	59,3
14589951	DNA directed RNA polymerase II polypeptide E	203	25	4	23,3
4240195	KIAA0853 protein	200	113	3	5,3
8922477	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E	197	81	6	6,9
113197968	KRT9 protein	185	48	3	5,8
55769552	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D	177	45	4	13,8
1667394	transcriptional regulator homolog RPD3	172	56	4	11,1
4507127	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	168	18	4	24,5
4504733	insulin receptor substrate 4	153	135	3	2,5
24429617	RNA polymerase III subunit RPC2	148	129	3	3,1
21755619	unnamed protein product	137	67	3	5,5
4505119	methyl-CpG binding domain protein 3	137	33	2	11,3
40674640	IQGAP1 protein	126	108	2	2,7
119609183	chromodomain helicase DNA binding protein 4, isoform α	126	219	2	1,6
7656977	calcitonin gene-related peptide-receptor component isoform a	118	17	3	36,5
6010112	guanine nucleotide exchange factor, delta subunit	110	58	2	4,6
2463577	PRP8 protein	106	275	2	1,8
34531573	unnamed protein product	106	20	1	9,2
4507133	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	100	9	4	25
188590	myosin light chain 3	100	17	2	15,9
4503519	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47kDa	93	38	2	8,4
1857944	serine kinase SRPK2	88	78	2	3,2
7706501	WW domain binding protein 11	84	70	2	2,8
40675359	EIF3S10 protein	78	75	2	2,5
10334526	WTAP protein	73	44	1	2,8
4507241	structure specific recognition protein 1	67	81	1	3,4
12711674	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B isoform 2	67	56	2	3,8
110002587	KRT1B protein	65	38	1	2,9
514266	unknown	65	29	2	10,3
24474791	small nuclear ribonucleoprotein component	55	96	1	2,5
5032069	splicing factor 3b, subunit 4	52	44	1	5,4
478844	G9a protein	51	114	1	2,7
7706499	DNA directed RNA polymerase III polypeptide K	47	13	1	8,3

Tabelle C.3: Ergebnisse der chromatographischen Reinigung des MIZ-1-Komplexes (Fraktion III).

D Ergebnislisten von cDNA-Microarray-Expressionsanalysen

Die Microarray-Analysen wurden von der Microarray-Arbeitsgruppe des IMT unter Leitung von Michael Krause durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte durch Birgit Samans. Die Microarray-Objektträger wurden im IMT hergestellt und enthalten jeweils Sequenzen, die 20000 Transkripte repräsentieren. Leere Zeilen in den Ergebnislisten bedeuten eine unbekannte Identität der entsprechenden Sequenz. Unter <http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cgi-bin/pro1> sind die Sequenzen der Klone abrufbar. Die verwendete *flip colour*-Technik beinhaltet eine getrennte Markierung jeder Probe mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, was durch die Markierung bedingte Schwankungen der Signalintensitäten meßbar macht. Zusätzlich geschahen die Experimente als Sandwich-Hybridisierungen, d.h. es wurden zwei einander zugewandte Objektträger als Doppelmessung mit derselben Probe behandelt, was eine Abschätzung der Meßgenauigkeit ermöglicht. Wegen der großen Zahl einzusetzender Objektträger wurden jeweils nur Proben miteinander verglichen, welche von Zellen stammten, die dieselbe shRNA-Sequenz exprimierten. Durch den fehlenden Vergleich Proben ohne aktiviertes MycER untereinander konnten keine durch die shRNA-Sequenzen verursachten Änderungen der Expression bestimmt werden. Dies geschah bei der anschließenden Validierung.

Bei der Analyse wurde jeweils willkürlich ein Mindest- bzw. Maximalwert der relativen Expression festgelegt, welcher mit hinreichender Stringenz von MycER aktivierte bzw. reprimierte von nicht beeinflussten Genen unterscheidet. Dieser betrug beim Microarray in U2OS MycER K9-Zellen (shscr und shh2az-1) 1,80 für aktivierte Gene und 0,56 (1/1,80) für reprimierte Gene. Beim Microarray in NIH3T3 MycER K1-Zellen (shscr und shmed24) betrug dieser 3,00 für aktivierte Gene und 0,33 (1/3,00) für reprimierte Gene. Es wurden ausschließlich Messungen in die Auswertung einbezogen, deren Qualitätsparameter (A-Wert) mindestens 8,50 betrug.

Ergebnislisten von cDNA-Microarray–Expressionsanalysen

Transkript	rel. Expr. (shscr)	rel. Expr. (shh2az-1)	Transkript	rel. Expr. (shscr)	rel. Expr. (shh2az-1)	Transkript	rel. Expr. (shscr)	rel. Expr. (shh2az-1)
RASL11B	6,13	1,18	TBP	2,44	1,30	IGHG1	1,96	1,55
GTF3C4	5,04	1,81	USP32	2,42	1,24	SIPA1	1,96	1,33
SFRS2	5,03	2,21	NCOA2	2,41	1,42	LTBP2	1,96	1,09
SLC7A5	4,85	2,07	AFP	2,39	1,30	ZNF202	1,95	1,51
	4,71	1,09	TOP2A	2,36	1,35	C7orf20	1,95	1,38
PEG3	4,63	1,13	TMEM97	2,35	1,60	TRABD	1,94	2,01
PIK3R1	4,09	1,42	FAM86A	2,35	1,42	ASAH1	1,94	1,32
BLMH	4,06	3,15	MGC10433	2,33	1,53	ET	1,94	1,22
SYNCRIP	4,02	1,02	IDH3A	2,31	1,34	NMT1	1,94	1,19
GOLPH3	3,95	3,01	RPIA	2,28	1,74	TMEM87A	1,94	1,06
ADAMTS6	3,95	0,98		2,27	1,12	INTS7	1,94	1,06
ARC	3,84	1,90	SFRS10	2,26	0,87	CAMSAP1	1,92	1,33
	3,67	1,11	KIAA0090	2,24	1,77	MKP-L	1,92	1,19
	3,58	1,73	CDC25B	2,24	1,68	FLJ32255	1,91	1,67
ODC1	3,49	1,68	TATDN2	2,23	1,58		1,90	1,61
S100A2	3,45	0,70	SIP1	2,22	1,64	ZHX1	1,90	1,38
PRKCBP2	3,37	3,24	LOC153222	2,21	0,96	NR2F1	1,90	1,18
SRP46	3,34	1,51	AVEN	2,21	0,75	RRS1	1,90	1,13
BMSC-MCP	3,3	1,92	TMEM5	2,20	1,35	NGFRAP1	1,90	1,12
	3,24	1,52	PCTP	2,20	1,35	SUSD4	1,89	1,61
SRP46	3,2	1,48	SFRS7	2,20	1,21	RANGAP1	1,89	1,29
C4orf29	3,18	0,84		2,20	1,02	DBNDD2	1,89	1,22
	3,12	1,63	RPS11	2,19	0,97	EIF3S9	1,88	1,15
	3,1	0,61	LOC401320	2,18	1,05	YARS2	1,87	1,14
TTYH2	3,03	2,19		2,18	0,93	AMID	1,86	1,25
CCHCR1	3,01	2,20	MGC33302	2,17	1,72	2'-PDE	1,86	1,21
MT1X	3,01	1,07	IL17D	2,16	1,45	CLCN7	1,86	1,14
HSPH1	3	1,02	THAP11	2,16	1,32		1,85	1,35
SEL1L	2,95	1,03	PPP2R2A	2,16	1,29	UCK2	1,85	1,18
AMD1	2,94	1,87	CROP	2,15	1,26	KHSRP	1,85	1,06
	2,89	1,13	MT1F	2,15	0,71	SNX9	1,85	0,68
CALU	2,87	1,60	SUOX	2,11	1,38	FLG	1,84	1,65
FLJ20551	2,86	1,44	ST3GAL4	2,11	1,24	ZNF521	1,84	1,15
EPS8L3	2,85	2,58	C2orf4	2,10	1,71	FLJ39349	1,83	1,49
CXCR4	2,81	0,77	TMEM97	2,10	1,63	FAT4	1,82	1,42
UBXD6	2,79	1,15	DLG4	2,10	1,54	LOC644662	1,82	0,96
ENY2	2,79	0,90	MECR	2,10	1,24	CTBP1	1,82	0,92
TRIB2	2,75	2,14	MT1M	2,10	0,75		1,81	1,14
GNPNAT1	2,75	1,51	RBBP8	2,08	1,71	EBNA1BP2	1,81	1,05
	2,75	1,10	NOL1	2,08	1,48	RNPS1	1,80	1,31
BCLAF1	2,74	1,13	DDX42	2,07	1,31	HEG1	1,80	1,26
WDR77	2,72	1,01	ZNF268	2,07	1,27	ITPA	1,80	1,09
POLR3H	2,66	1,18	ENC1	2,07	1,22	DHX36	1,80	0,79
MANEAL	2,61	1,57	ANAPC1	2,06	1,22			
RBM3	2,61	1,30	LY6G5B	2,05	1,11			
SHQ1	2,59	1,30	NCF1	2,05	1,07			
UCK2	2,57	1,72	TTLL12	2,04	1,94			
E2F4	2,56	1,32	DCUN1D5	2,03	1,33			
MNAB	2,56	1,21	PPIE	2,03	1,10			
RPS23	2,56	0,89		2,02	1,27			
HSPE1	2,55	0,92	UBE2N	2,02	1,12			
WDR55	2,53	1,81	ABCC5	2,01	2,35			
FLJ20758	2,52	1,43	C21orf45	2,01	1,20			
SF1	2,52	1,41	SOD2	2,00	1,18			
ABCA3	2,49	1,74	SLC35B3	2,00	1,00			
OAZ1	2,49	1,10		1,99	1,02			
	2,48	1,25	EYA2	1,98	2,00			
CCDC86	2,47	1,30	CTNS	1,98	1,52			
SLC31A2	2,47	1,17	GPA33	1,98	1,36			
C18orf55	2,46	1,13	CPSF6	1,98	1,28			
AFF4	2,44	2,18	TTC1	1,98	1,09			
NCL	2,44	1,40	LOC646762	1,97	1,51			

Tabelle D.1: Expression aktivierter c-MYC–Zielgene nach *H2A.Z-knockdown* in humanen Osteosarkomzellen (U2OS). Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen angegeben.

Ergebnislisten von cDNA-Microarray–Expressionsanalysen

Transkript	rel. Expr. (shscr)	rel. Expr. (shh2az-1)	Transkript	rel. Expr. (shscr)	rel. Expr. (shh2az-1)	Transkript	rel. Expr. (shscr)	rel. Expr. (shh2az-1)
DVL2	0,56	0,87	PFKM	0,46	0,78	PAQR8	0,28	1,10
	0,55	1,26	BBS7	0,46	0,94	BBX	0,28	0,32
IK	0,55	0,81	IRF2	0,45	1,02	DAB2	0,27	0,87
OX 40L	0,55	0,80	GSTO1	0,45	0,78	SLC6A16	0,26	0,99
PARP9	0,55	0,77	IL10RB	0,45	0,93	KLHL24	0,24	0,82
PCMT1	0,54	0,56	DPYS	0,45	0,64	RARG	0,24	0,92
UACA	0,54	1,03	GABARAPL2	0,44	0,66		0,24	0,60
ABHD10	0,54	0,76	TPS1	0,44	0,73	EML2	0,22	0,64
ZNF720	0,54	0,78		0,44	0,80	CCL2	0,20	0,50
ZNF161	0,54	0,74	BNIP3L	0,44	0,73		0,19	0,68
SGCB	0,53	0,89	LOC388931	0,44	0,66	PLEKHH2	0,18	0,96
DIO2	0,53	0,61	ARL8A	0,44	0,88	PDGFRA	0,18	1,40
NRN1	0,53	0,89	C6orf108	0,43	0,70		0,18	1,41
HIP2	0,53	0,70	FLOT1	0,43	0,74	PLAG1	0,15	0,89
MAP1LC3A	0,53	0,91	RPL17	0,42	0,63	SLC2A14	0,15	1,54
SMOX	0,53	0,69	COX7A2L	0,42	0,67			
RAB24	0,52	0,98	RPSA	0,42	0,55			
MFAP2	0,52	0,44	TP53I11	0,42	1,00			
KIAA1522	0,52	0,85	DDR2	0,42	0,68			
LOC84661	0,52	0,69	EPAS1	0,41	0,98			
GSK3B	0,52	0,79	CDKN2C	0,41	0,91			
ZFYVE1	0,52	0,76	PRPF40B	0,41	1,24			
PCGF5	0,52	0,56	SRPRB	0,40	1,04			
	0,52	0,96	PPAP2B	0,40	0,55			
PTTG1	0,52	0,62	SP100	0,40	1,00			
OAZ1	0,52	0,61	DAD1	0,40	0,75			
C10orf83	0,51	1,32	TBC1D22A	0,39	1,15			
CDKN1A	0,51	1,17	IMPDH1	0,39	0,84			
MAP4K2	0,51	0,72	C10orf10	0,39	0,70			
RPL10	0,51	0,61	FUCA1	0,39	1,21			
KIAA0127	0,51	0,65	RAB31	0,39	0,37			
SYNGR1	0,50	0,65	WBP2	0,38	1,03			
UBE2C	0,50	0,63	JARID1B	0,38	0,50			
ATP6V1F	0,50	0,77	DDT	0,37	1,11			
C20orf19	0,50	1,16	LARP6	0,36	0,80			
OVOS2	0,50	0,98	GSTP1	0,36	0,65			
MRPL43	0,50	0,68	TMEM159	0,36	0,44			
MUC15	0,50	0,88	PDK4	0,36	0,85			
PRMT2	0,50	0,85	RIT1	0,36	0,59			
STK4	0,50	0,82	TIMM17B	0,36	0,48			
KIFC1	0,50	0,63	JUNB	0,36	1,05			
ARID1A	0,49	0,77	KLF7	0,36	0,74			
SUGT1	0,49	0,45	OAZ2	0,35	0,60			
ACVR1B	0,49	1,04	PYHIN1	0,35	0,97			
CSRP2	0,49	0,62	ECE1	0,35	1,25			
C20orf194	0,48	0,60	SWAP70	0,34	0,80			
FTS	0,48	1,07	RNF41	0,34	0,86			
RGS8	0,48	0,68	WSB1	0,34	0,49			
CIT	0,48	0,80	BEX1	0,34	0,81			
GSTM3	0,48	0,65	GABARAP	0,34	0,39			
EPPB9	0,48	0,63	MAPRE3	0,33	1,08			
RAB9A	0,47	1,06	MTIF2	0,31	0,90			
SDF2	0,47	0,48	TRAF3IP2	0,31	0,99			
LGALS9	0,47	0,67	RUSC1	0,31	0,90			
ATF2	0,47	0,76	CDS1	0,30	0,73			
CROP	0,46	0,89	GABARAPL1	0,30	0,91			
AAK1	0,46	0,86	HBLD1	0,30	0,57			
MRLC2	0,46	0,71	WDR37	0,30	0,94			
C14orf119	0,46	0,64	WBP5	0,30	0,43			
BDH2	0,46	0,81	ENO2	0,30	1,11			
	0,46	0,49		0,30	0,82			
STRA13	0,46	1,03	SRCAP	0,29	0,53			

Tabelle D.2: Expression reprimierter c-MYC–Zielgene nach *H2A.Z-knockdown* in humanen Osteosarkomzellen (U2OS). Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen angegeben.

Ergebnislisten von cDNA-Microarray–Expressionsanalysen

Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24
Prdx3	H3140D07	43,13	0,63	Pdcl3	H3123B02	7,94	1,54	Nt5c	H3091E02	5,97	1,29
Tgfb14	H3096C06	18,53	0,36	Serpi1e	H3082C01	7,84	1,63	Armet	H3009A06	5,96	1,72
Ephx1	H3110F10	18,31	0,99	Ltb4dh	H3040C04	7,84	1,04	Itgb4bp	H3121C05	5,96	1,12
Lamr1	H3152E01	15,89	1,32		H3141E04	7,82	1,31	Ipo7	H3011B06	5,95	1,02
	H3123C07	15,41	0,91	Dstn	H3122E03	7,79	0,70	Ncl	H3016D12	5,93	0,41
Itm2a	H3150G01	14,94	0,84	Ranbp1	H3104D06	7,77	0,87		H3148D09	5,91	0,74
	H3121C03	14,21	0,93	Ech1	H3131A07	7,76	1,47	Uqcrcl	H3080H01	5,91	0,97
	H3039E07	13,76	0,86	Galk2	H4068F02	7,74	1,11	LOC38162	H3148G07	5,90	1,68
2973G15Rik	H3102G04	13,72	1,60	Eef1a1	H3040C12	7,73	0,77	Acp1	H3139G09	5,87	0,95
	H3126A06	13,58	0,88	rs	H3039D02	7,73	0,55	28143M8Rik	H3016A11	5,85	1,03
Npm1	H3136B08	13,55	0,92	Eef1a1	H3011G07	7,72	0,83		H4018G08	5,85	0,49
Eef1a1	H3138D12	13,50	0,77	Rpl3	H3112F09	7,68	0,83	Igbp1	H3006G01	5,84	1,24
	H3126H10	13,45	0,79	Rpl3	H3096G04	7,62	0,77	Aasdhppt	H3010C01	5,81	0,89
129K13Rik	H3046D08	13,35	1,02	617P6Rik	H3001D11	7,60	1,12		H3098B01	5,80	1,45
	H3036C09	13,28	0,88		H3079A06	7,60	0,83		H3003H02	5,79	0,98
Npm1	H3136B07	13,25	0,98	Psmc7	H3045D06	7,56	0,60	Vti1b	H3152D11	5,78	1,47
BC3544	H3148D07	12,91	0,92	Syngtr	H3133E09	7,51	1,63	AW551984	H3129B10	5,78	0,96
Bnip3	H3136C07	12,60	0,94	ORF18	H3135C11	7,51	1,27	AA792894	H3148C09	5,78	0,88
Idh3a	H3049E07	12,13	0,48	28149H7Rik	H3079H01	7,37	1,10		H3118C05	5,77	1,02
Nup43	H3156H10	12,10	0,85	Eef2	H3129C01	7,26	1,00	BC37112	H3142B04	5,77	1,55
	H3140F07	12,06	0,79	Eef1d	H3005H10	7,26	1,12	Pmm1	H3083C04	5,74	1,29
	H3133F11	11,95	1,00		H3123A12	7,22	1,26	Eprs	H3154C11	5,72	0,77
Cnbp1	H3117E04	11,93	0,66		H3139D08	7,21	1,11	Ttrap	H3085C02	5,72	0,57
Spp1	H3082C12	11,82	1,13	Calm2	H3006H05	7,14	1,08	Hadh2	H3123H01	5,72	1,26
Cnbp1	H3123E02	11,75	0,71		H3027H10	7,13	0,34	Bccip	H3150F12	5,69	1,00
	H3004C09	11,60	0,99	Rpl4	H3140F10	7,13	0,90	Zfyve21	H3146C03	5,69	1,45
	H3136A11	11,59	0,90	Thrap6	H3066G07	7,06	1,41	Ntan1	H3091F08	5,69	1,40
Hnrpc	H3048H01	11,59	1,12		H3129H07	7,06	0,80	Bloc1s2	H3150E01	5,63	1,37
Rras2	H3113E07	11,53	0,93	Cfdp1	H3080H09	6,99	0,82	Tnfsf9	H4029F11	5,63	1,13
Acat1	H3087H05	11,32	0,94		H3140G10	6,93	0,90		H3041H07	5,60	1,01
Mylc2b	H3027H08	11,21	1,58		H3020D07	6,91	0,94	Psip1	H3088C03	5,58	0,47
Rpl3	H3112F11	10,97	0,99	Ltb4dh	H3039F01	6,90	0,96		H3147G05	5,55	1,03
1112A9Rik	H4034B01	10,88	1,17	Hspa5	H3051C06	6,89	0,41	D5333C11Rik	H3006B06	5,53	1,39
151L15Rik	H3151A07	10,79	1,39	1114F1Rik	H3127C04	6,88	0,83	Tgfr	H3150A05	5,52	0,96
Rpl3	H3112F10	10,62	0,99	Clns1a	H4052A09	6,86	0,84	Ar1	H3091A08	5,52	0,67
Tm4sf7	H4003C08	10,54	0,72	Txndc7	H3140F06	6,85	0,59	Bxcd1	H3099G08	5,52	0,97
D4342O9Rik	H3133B08	10,50	0,82		H3018A01	6,83	0,94	Groc2f	H3135E12	5,51	1,14
Pros1	H3142A10	10,48	1,29	Gatm	H3133E07	6,81	1,11		H3011F03	5,49	0,80
Sars1	H3039G04	10,37	0,60	Gat17	H3127E06	6,76	0,99	Commd3	H3125D07	5,48	1,47
Cd9	H3139C03	10,34	0,87	A9315D3Rik	H4077H02	6,75	0,84	Fcgrt	H3153G01	5,48	0,98
	H3130D04	10,23	1,56		H4026C10	6,75	1,25	Pecr	H3029A03	5,45	1,52
	H3027E12	10,17	1,42	Hmgb2	H3113B06	6,74	0,84	Rpl6	H3081A06	5,44	1,14
Calm2	H3006H07	10,14	1,28	2415K2Rik	H3124G11	6,68	0,36	Pik3cb	H3040C03	5,44	0,84
	H3118H01	10,12	0,70	Ddt	H3135H10	6,67	1,07	Vps24	H4061E09	5,44	1,20
Ghitm	H3136F05	9,99	1,11	Laptm4b	H3130B01	6,64	1,02	Psmc8	H3138C05	5,43	1,20
Cryz1	H3135A07	9,94	1,12		H3121G10	6,62	0,64	Ccnd2	H3152D01	5,43	0,95
18157E1Rik	H3147H04	9,83	1,04		H4021G08	6,60	1,04	Pldn2	H4017E07	5,42	1,04
Bst2	H3056G04	9,73	1,56	Cryz1	H3123G05	6,56	1,01		H3147G06	5,41	1,07
Psmc4	H3039C02	9,72	1,26	Psmb5	H3154G12	6,55	1,56	Eb1bp2	H3028G10	5,40	0,77
Mrps31	H4054C03	9,64	1,35	Cdk4	H3147D06	6,54	0,90	Hrmt12	H3004H06	5,37	1,07
Ccng1	H3077H03	9,36	1,46	Sbno1	H3117C09	6,50	1,13	Eif2s1	H3114A11	5,37	1,08
PspH	H3139A09	9,32	1,14		H4054F11	6,50	1,48	297E19Rik	H3080B08	5,36	1,03
Creb3	H3136G09	9,28	1,13	Serpinb6a	H3135G03	6,50	1,24	633577E15Rik	H3151B11	5,33	1,00
	H3094E07	9,26	0,89		H3142F01	6,48	1,58		H3115D02	5,31	1,03
C7732	H3093A10	9,25	0,54	Ube2d3	H3090H02	6,47	1,04	Rseh2a	H3025A06	5,31	1,20
Mfap2	H3136A08	9,20	1,01	Eif3s1	H3026D11	6,45	0,48	1612F9Rik	H3074H07	5,30	0,76
Mt1	H4053E06	9,19	0,99	Eif4e	H3134G10	6,44	0,64	Ldh2	H3128G04	5,30	1,20
Chchd3	H3155G09	9,18	1,46	Rpl13a	H3136G06	6,42	1,13	BC1787	H3074D07	5,28	1,35
1114F1Rik	H3021H04	9,10	0,87	Ramp3	H4077A03	6,41	1,13	Vps35	H3158C04	5,28	0,83
Arbp	H3118D03	8,94	1,11	Fhl2	H3033C07	6,40	1,08	Scye1	H3155H05	5,27	1,10
Tomm2	H3038G11	8,93	1,38	Nsep1	H3086B04	6,39	0,70	Lamb1-1	H3147C04	5,26	0,96
Ngfrap1	H3153D07	8,84	1,67	Slc14a1	H3148E09	6,37	0,74	23144P18Rik	H3085A05	5,26	1,24
	H3121E02	8,83	0,73	Hebp1	H3152G09	6,37	1,29	Sf3b1	H3151G01	5,25	0,56
	H3040C11	8,81	0,74	Sars1	H3010C06	6,33	0,57	Lamr1	H3115D01	5,25	1,11
18136124Rik	H4017C04	8,80	0,58	Rbbp7	H3102D09	6,32	0,55	Vdac2	H3138D07	5,24	0,76
Eef1a1	H3139D07	8,69	0,83	Sca1	H3049D03	6,32	0,67		H3152B10	5,22	1,11
	H3077C09	8,60	1,01	Anxa7	H3067E04	6,31	0,83	Mrpl12	H3018B03	5,22	1,18
Bsg	H3020G04	8,56	1,50	Txndc7	H3136D03	6,30	0,58	Ptpn2	H3150B11	5,22	0,87
Gtf2f2	H3128F08	8,53	1,20		H3157A11	6,29	0,83	AA66869	H3099G12	5,21	1,35
Taldo1	H3153E09	8,52	1,14		H3153B02	6,26	1,24		H3028D02	5,20	1,14
	H3067E01	8,51	0,92	Hibadh	H3150G03	6,23	0,65		H3126C02	5,19	1,19
1721I9Rik	H4028B11	8,51	0,54	Coq3	H3038E10	6,23	1,56	Nt5c3	H3150F09	5,18	0,60
221415M2Rik	H4070G09	8,46	1,07	4831416G18Rik	H3026C11	6,22	0,46	Gm169	H3094H05	5,18	1,08
	H3114A01	8,44	0,77	Ap3s1	H3080E11	6,20	1,21		H3138A09	5,14	0,88
	H3155H03	8,43	0,88	Rpl4	H3130A12	6,13	1,05		H3002B02	5,12	0,92
Eif3s3	H3155F12	8,38	1,35	Banf1	H3121B04	6,12	1,27	2611J5Rik	H3126C06	5,12	1,89
Exosc1	H3019F01	8,35	1,04	1734H14Rik	H3148H07	6,12	0,99		H3004G04	5,12	1,09
	H3129D12	8,33	0,94	Csda	H3132D03	6,11	0,64	Asns	H3154F02	5,11	0,61
Eef2	H3129C02	8,30	1,01	Apex1	H3007F01	6,09	0,88	Ctsl	H3028F03	5,11	0,84
Lims1	H4025G02	8,29	0,59	D2Ert75e	H3077A01	6,09	1,58	Ifi22b	H4071A02	5,07	1,05
Npc2	H3115C04	8,27	1,21	Tusc3	H3093G07	6,06	0,72		H4078G02	5,07	1,03
Anxa5	H3016C05	8,23	1,04	Eef1g	H3126H04	6,05	1,10	Rpl4	H3125H06	5,05	0,99
	H3046F11	8,19	0,84	Spon2	H3129E11	6,02	0,79	Ppat	H3026B04	5,05	0,43
Lix1	H3080B07	8,18	1,02	Nsf1c	H3128D12	6,02	1,08	Calm2	H3006H06	5,04	1,18
Impdh2	H4057B09	8,14	0,75	6111N22Rik	H3014H02	6,02	0,90	D7347P14Rik	H3114E05	5,04	0,60
Etfa	H3140D12	8,08	1,10	2738L12Rik	H3155E12	5,99	0,90	Xlr3b	H3060F01	5,03	1,20
Ostf1	H3039E08	7,98	1,16	Cops6	H3113E08	5,98	1,25	236M17Rik	H3032H08	5,03	1,23
C78541	H3128E08	7,97	1,08	Eef1e1	H3100H12	5,97	1,08	253M1Rik	H4078H10	5,00	0,88

Tabelle D.3: Expression aktivierter c-MYC–Zielgene nach *med24-knockdown* in Mausfibroblasten (NIH3T3 MycER K1), Teil I. Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen in shscr (scr)- und shmed24 (med24)-infizierten Zellen angegeben.

Ergebnislisten von cDNA-Microarray–Expressionsanalysen

Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24
Hprt1	H3152G02	4,99	1,06	Rrbp1	H3009F11	4,38	0,89	573555F13Rik	H3158E02	3,91	0,90
2619I2Rik	H3035B03	4,99	0,68	Rpo1-1	H3049D09	4,36	1,04	Eef1g	H3114H04	3,91	1,06
Rps5	H3112G03	4,98	1,25	Tmpit	H3046F12	4,36	1,40	Senp6	H3049A01	3,91	0,60
Ankrd1	H4026E03	4,98	0,87		H3032A01	4,35	0,94	Kat1	H3122B03	3,91	0,71
Bcas2	H4015F09	4,97	1,07		H3023H11	4,35	1,52	Aga	H3025D10	3,90	1,41
Gpx1	H3158C07	4,97	1,31	Pttg1	H3142D06	4,33	1,65	Rabac1	H3105F01	3,89	1,41
C4314M2Rik	H3028D01	4,96	1,11	Cil2	H4024H01	4,33	0,93	6111I4Rik	H3095F05	3,89	1,33
Cenpa	H3106B10	4,96	1,60	18114L12Rik	H3158B11	4,31	1,09	Gsto1	H3095E06	3,89	1,26
Rpl7	H3125G11	4,95	1,07	Nedd4	H4057C10	4,30	0,99	Rps9	H3055A09	3,88	1,53
Ssr1	H4071E08	4,95	0,90	Nxt1	H3125C03	4,29	1,26	Rpl4	H3134G05	3,88	0,86
Rpo1-3	H3022B05	4,95	1,11	Hrsp12	H3122B07	4,29	1,59		H3027B06	3,88	0,61
1192L16Rik	H3093F01	4,94	1,16	Mdh1	H3052A04	4,28	1,53	Rgs3	H4024G01	3,87	1,12
Epn2	H3150C12	4,93	0,90	Anxa2	H3126C03	4,28	1,35	St13	H3125D09	3,86	1,01
Sdcccag1	H3082D02	4,90	0,49	Mpv17	H3140G06	4,27	1,13	Ccng1	H3034H06	3,85	0,88
	H3023H10	4,89	1,71	Cdv3	H3027G07	4,27	1,19		H3115D03	3,84	1,00
Trib3	H3035B01	4,88	0,70		H3148B10	4,27	1,23	Slc29a1	H3151B02	3,83	0,51
18136I24Rik	H3060A01	4,87	0,72		H3028D05	4,26	1,02	Cct4	H3027F12	3,81	0,54
	H3034F10	4,86	0,56	Vkorc1	H3137D12	4,26	1,16	Calu	H4047B02	3,81	0,66
	H3126H02	4,86	0,85	Pa2g4	H3024B11	4,25	0,48	Gcpiip	H3056C11	3,81	1,48
Cct7	H3110F02	4,85	0,56	Mrps1	H3014A01	4,25	1,23	Gtf2e2	H3144B01	3,81	1,08
BC68171	H3066D04	4,83	0,54	Bcap37	H3102E12	4,25	0,66	Igfbp4	H3106E03	3,80	0,77
Rpl6	H3144E09	4,81	1,29	262E23Rik	H3010D05	4,24	1,04	Ypel5	H3156E02	3,80	1,06
	H3011H10	4,81	1,11	Tpd52I2	H3079H04	4,23	1,48	Mrpl15	H3026B03	3,79	1,12
Vbp1	H3020D11	4,78	1,12	D18Wsu98e	H3132B08	4,23	0,78	Wbscr21	H3055B04	3,79	1,20
28141A8Rik	H3074C08	4,77	1,10	Psmb7	H3008G03	4,22	1,08	Rarsl	H3051D07	3,79	0,55
Gpt2	H3057C08	4,77	0,93	Mat2b	H3087B04	4,21	0,82		H3121D06	3,79	0,82
	H3114B06	4,76	1,39	Fh1	H3024F07	4,20	0,81	A37L17Rik	H3087E08	3,78	1,06
Mad2l2	H3152G07	4,76	1,26	Lass4	H3129C07	4,20	1,17	Chd8	H3153D04	3,78	1,49
Hrc	H3127D04	4,76	1,38	Hnrpc	H3008F04	4,19	1,40		H3015H12	3,77	0,98
	H3058G12	4,73	1,17		H3159B12	4,18	0,72		H3142B10	3,77	0,98
Ctsl	H3028F04	4,72	1,05	56341J11Rik	H3157E02	4,18	1,17	Oxa1l	H3129E06	3,77	1,21
Ppie	H3009E12	4,72	0,96	Plac8	H3009D03	4,18	1,42	Usp1	H3140B02	3,77	0,97
	H3098H09	4,71	1,38	Conh	H3010D03	4,17	0,96	Sat1	H3114A06	3,76	1,65
Stard3nl	H3134B10	4,70	0,92	Txn12	H3008C02	4,17	1,03	BC13529	H3138C07	3,76	0,87
23157G13Rik	H3051G06	4,70	1,71	E5311G23Rik	H3158G11	4,17	0,95	Txn2	H3056G10	3,75	1,01
Timm8a	H3008G05	4,70	0,81		H3077A08	4,14	1,42	Chchd4	H3021H01	3,75	1,15
Rpl8	H3141F09	4,69	1,16	Capza2	H4060A10	4,14	0,77	Pcnx13	H3144G01	3,74	1,23
2973G15Rik	H3104F01	4,68	1,56	Rpl8	H3011E01	4,14	1,22	Laptm4a	H3067E03	3,74	0,98
Srp9	H3108B05	4,68	1,04	2413A14Rik	H4016A10	4,14	1,09	Spc3	H3028H03	3,74	1,08
D1359P3Rik	H3127C08	4,68	0,66	Gemin6	H3029G04	4,13	1,26	Cd24a	H3155C06	3,74	0,78
Rac1	H3159G02	4,68	1,27	Comm3	H3063H12	4,13	1,55	Hsp15	H3049B07	3,74	0,57
Txnip	H3128D02	4,67	3,81		H3126B04	4,11	1,53	BC65123	H3094C03	3,73	0,89
2315E1Rik	H4015E09	4,66	1,35	Polr3h	H3159E05	4,11	0,62	Cct5	H3147A03	3,73	0,65
Tubb5	H3139D02	4,65	0,73	Lcn2	H3083G02	4,11	1,29	Nsep1	H3031D10	3,73	0,66
Umps	H3005D03	4,65	0,65	Dazap2	H3129B04	4,11	0,90	Acy1	H4025D03	3,73	0,91
1311I1Rik	H3141H08	4,64	0,69	Mdh1	H3025C05	4,11	1,61	Uqcrc1	H3031F01	3,72	0,93
	H3064C11	4,64	0,59	Exosc8	H3154D05	4,10	1,17		H3153G04	3,72	0,87
Metap2	H4046H06	4,64	0,62	614B21Rik	H3128D03	4,10	1,29	Hrmt1l4	H3029B12	3,72	0,84
Tcf4	H3114D12	4,63	0,80	Serpinb6c	H3033B11	4,09	1,37	Senp6	H3049D01	3,72	0,57
94315G1Rik	H3122C04	4,63	1,28	Gmn1	H3113C05	4,09	1,28	Gpx4	H3114A05	3,70	1,37
	H3127C05	4,60	0,83	Rpp3	H3080G08	4,08	1,17	Rpl1a	H3116A03	3,70	1,13
Asf1a	H3063H04	4,59	1,34		H3141A04	4,08	1,00		H3074B02	3,70	0,89
	H3027B05	4,59	0,58	Pttg1	H3084H09	4,08	1,80	Jtv1	H3136G01	3,70	1,30
Metap2	H3028G08	4,59	0,49	Rnf7	H3146A01	4,07	1,22	Timp3	H3109C02	3,70	1,08
AW5521	H3129C08	4,58	1,05	Pole4	H3126A12	4,07	1,19		H3125D05	3,69	1,01
Eif3s2	H3025D04	4,58	1,19	Adfp	H3144F06	4,07	1,05	Rtcd1	H4003G03	3,69	1,09
Man2a1	H3114D03	4,57	0,83	Zfp61	H3133A12	4,05	0,41	Sdf4	H3042A07	3,69	1,04
Snx5	H3102C01	4,56	0,79		H3126H03	4,05	1,14	Ssrp1	H3004F09	3,68	0,71
F8314G6Rik	H3140C05	4,56	0,93		H3139E01	4,04	0,35	Lamc1	H3113A09	3,68	1,16
Eif1ay	H3138H03	4,56	1,03		H3138A08	4,03	1,10	619E2Rik	H3010G10	3,67	1,22
	H3011D09	4,56	1,03	Rset2	H3045A05	4,03	1,15	Psm4d	H3124D05	3,67	1,12
Npc2	H3077D05	4,55	1,17		H4072F11	4,03	1,39	Clk1	H3027C12	3,67	1,02
Ctsd	H3156A10	4,54	0,70	Cdc37	H3016E05	4,01	0,79	Frm3	H4008D03	3,66	1,16
11159P8Rik	H4016F03	4,54	1,19	Eif3s5	H3002D04	4,01	1,16		H3140F03	3,66	0,61
Cks1b	H3112A12	4,54	1,71	Tnfrst12a	H3057E07	4,01	1,25		H3050D03	3,66	1,14
Clu	H3108A04	4,53	1,03	Rnf19	H3153A08	4,00	1,05	1112B5Rik	H3002A03	3,65	1,06
Sf3b5	H3134G08	4,53	1,47	Syvn1	H3133C11	4,00	0,81	6139A15Rik	H3146D03	3,64	0,61
	H3027E01	4,53	1,80	Arpc2	H3040D08	3,99	0,89		H3038C09	3,64	0,80
Scpep1	H4067A03	4,53	0,60		H3004G12	3,99	1,21		H3079G03	3,64	1,08
	H3048H10	4,53	0,31	Gs	H3150F07	3,99	0,87		H3154H07	3,64	0,43
Tbc1d14	H3054B06	4,52	1,11		H3107E10	3,98	1,13		H3115H06	3,64	1,44
Osbpl9	H3060B02	4,51	0,77	Nxt1	H3125E02	3,98	1,31	Za2d3	H3126D08	3,63	0,72
Gpsn2	H3123A04	4,50	1,15	Eif4a1	H4001F02	3,98	0,78	Alg5	H3022D02	3,63	0,92
C1d	H3066D01	4,49	1,22	Trp53inp1	H4077B04	3,98	1,18	Eif4a2	H3081A02	3,63	0,70
Tmem33	H4051B07	4,48	1,15	Gnpt1	H3099F05	3,97	1,05	Ard1	H3121B11	3,62	1,29
Rnu64	H3004D12	4,48	1,63	Gfer	H4060A01	3,97	1,12	Smu1	H3147B05	3,62	0,56
Cacnb3	H3117A06	4,47	0,75		H3148E08	3,97	1,44	Slc25a17	H3032A09	3,60	0,63
Col12a1	H4025E04	4,46	0,99		H3145H08	3,96	1,25		H3028D03	3,60	0,87
Eef1a1	H3129A10	4,46	0,92	Cdkn2c	H3113F07	3,96	1,40	Psm1	H3108E09	3,60	1,75
Bxdc1	H3021B12	4,45	0,98		H3112H08	3,95	1,36	26124K14Rik	H3080C04	3,60	1,04
Gabarapl1	H4032H09	4,44	0,78	Csnk2b	H3133G04	3,95	0,95	Ranbp1	H3006B07	3,60	1,04
Rps9	H3153C11	4,43	1,29		H3038G08	3,94	0,80	Col4a3bp	H3089G05	3,59	1,31
Grpel2	H3134D06	4,42	1,15		H3144G04	3,94	1,32	Phca	H4028H12	3,59	1,14
Il1r1	H4079E06	4,42	0,67	Fars1	H3135H05	3,93	0,90	221412K9Rik	H3022G05	3,59	0,96
Rpl1	H3144C06	4,41	1,22		H3020B07	3,93	0,68	Rpl4	H3011G12	3,58	0,76
Eef2	H3144H11	4,41	0,97	Nfe2l1	H3156F10	3,92	0,97	Usp7	H3074F07	3,58	0,91
Fip111	H3038B04	4,39	0,63	Psm4d	H3081H11	3,92	1,32		H4001A02	3,58	0,78
Peci	H3153H05	4,39	1,02	LOC14433	H3025F11	3,91	1,46	Ndufa8	H3135A03	3,57	1,10

Tabelle D.4: Expression aktivierter c-MYC–Zielgene nach *med24-knockdown* in Mausfibroblasten (NIH3T3 MycER K1), Teil II. Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen in shscr (scr)- und shmed24 (med24)-infizierten Zellen angegeben.

Ergebnislisten von cDNA-Microarray–Expressionsanalysen

Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24
Rps16	H3112H11	3,57	1,42	Acat1	H4024F01	3,35	0,94	1112M19Rik	H4017D11	3,13	0,79
Dtymk	H3102A04	3,56	1,26	Kcnk6	H3078A03	3,35	0,84	Map2k1ip1	H3147F10	3,13	1,28
Hmga1	H3029B11	3,56	0,84	Usp9x	H3150A04	3,35	1,03	D11Wsu68e	H3020E02	3,13	1,47
	H3117A09	3,55	0,78	Tmem14c	H3025C10	3,34	1,25		H3085H02	3,13	0,71
Cdk5rap3	H3132G11	3,55	0,75		H3094B04	3,34	1,42		H3040E03	3,13	1,12
Eef1a1	H3121H05	3,55	0,85	Psmc7	H3114E02	3,34	0,64	Etfb	H4016B05	3,13	1,05
C85539	H3051H06	3,55	1,09	Blvrb	H3048G11	3,34	1,36	Smc4f1	H3132G05	3,12	0,76
	H3144E10	3,55	1,13	Rpl1	H3036C07	3,34	1,25	718K8Rik	H4068G09	3,12	1,08
31182117Rik	H3028E07	3,54	0,56	Pafah1b3	H4031C11	3,33	1,41	Cluap1	H3129E01	3,12	0,70
Mlh3	H3113D12	3,54	1,36		H3128D11	3,33	0,85	Serpinh1	H3125A07	3,12	1,02
425O18-1	H3090A12	3,54	1,04		H3023B08	3,32	0,77	Gnb2	H4030C07	3,12	1,00
Atp5g2	H4007E08	3,53	1,30	Wisp2	H4067A01	3,32	0,79	Timm17b	H3125F07	3,11	1,69
24118G2Rik	H3106G03	3,53	1,39	Rpp14	H3022B12	3,32	1,08	Med6	H3077D08	3,11	1,48
	H3045G10	3,53	1,00	Dscr2	H3129G11	3,32	1,06	Sbds	H4033H01	3,11	1,01
D13Wsu5e	H3054H05	3,52	1,24	1532H18Rik	H3013H06	3,32	1,03	Rnf153	H3060G09	3,11	0,91
Ndufv2	H3133D04	3,52	0,82	2818M24Rik	H3155F07	3,32	0,61	Gstm1	H3133A06	3,11	1,02
Mki67ip	H3018G05	3,52	0,63	Lamc1	H3113E11	3,31	0,91	Cul1	H3087D05	3,11	0,91
	H3129F04	3,51	1,28	Sh3gl3	H4035F10	3,31	1,16		H3125A05	3,10	1,55
Tpd52l2	H3081C01	3,51	1,18	Rnmtl1	H3012H02	3,31	1,00	Eif1a	H3114A08	3,10	0,66
Cope	H3155F09	3,51	1,40	Ormdl2	H3081H12	3,31	1,33		H3155H01	3,10	1,31
Rnut1	H3093C08	3,51	0,87	Scp2	H3122G01	3,30	0,71	Atf4	H3124E06	3,10	1,17
	H3147C03	3,51	0,93	Mrpl44	H3118A12	3,30	1,06	Agpat5	H3031H01	3,10	0,92
Uchl5	H3009C05	3,50	0,96	Pabpc4	H3032A06	3,30	0,85	Pbef1	H3085A11	3,10	0,77
Sucla2	H3070E04	3,50	0,76	Prkra	H3024F08	3,29	1,06		H3113H11	3,09	0,91
Sufu	H3060G08	3,50	1,22	Ran	H3151A05	3,28	1,11	Dars	H3150A07	3,09	0,72
Gss	H3050C02	3,50	0,63		H3091E09	3,28	0,80	Ppp1r7	H4051F03	3,09	1,16
Gnb2-rs1	H3083H02	3,50	1,19	Rps16	H3112H10	3,28	1,30	Gstm2	H3159G05	3,08	1,55
Pbk	H3009E09	3,49	0,74		H3121H08	3,28	0,74	Mfge8	H3126F11	3,08	0,78
	H3147G04	3,49	1,22		H3132G03	3,27	1,66	Prpf31	H3141A08	3,08	0,82
Taf5l	H3146H05	3,49	0,86	Bpgm	H3142C11	3,27	1,02	Eef2	H4042F07	3,08	0,93
Eif3s3	H3124A11	3,49	1,25	Rab11fip5	H3147B02	3,26	1,20	Eif2b3	H3022A07	3,08	0,73
Psmc12	H4015F05	3,48	0,93	23116C16Rik	H3122G08	3,26	1,68	Pdk1	H3028H06	3,08	0,85
Bhlhb9	H3028C02	3,48	1,19		H3142B09	3,26	1,22	Tsta3	H3147H11	3,07	1,13
Ipo7	H3100C04	3,48	1,02	Zfp265	H3009D06	3,26	0,72	Gt(ROSA)26asSor	H3146H11	3,07	0,57
Mrpl3	H3129B03	3,47	0,65		H3110B08	3,25	0,72		H3054D02	3,06	1,03
Psmc2	H3015G05	3,47	0,83	Ptdsr	H3142H08	3,25	1,01	Psmc1	H3134B07	3,05	0,93
Avp1	H3002H10	3,47	1,50	Hn1	H3045H10	3,25	0,94	3113A17Rik	H3142B05	3,04	1,45
Rpl15	H3027H01	3,47	1,41		H3116B11	3,25	1,42	Sypl	H3008E05	3,04	0,72
Tmem4	H3155G06	3,46	1,34	Rpl15	H3027H06	3,24	1,29	H2-Ke6	H3139G07	3,04	0,84
533425B17Rik	H3142H05	3,46	1,28	Fnta	H3150F06	3,24	0,81	Ssr2	H3011C06	3,04	1,37
Acp1	H3033B10	3,46	1,00	6133H9Rik	H3045H03	3,24	1,32	1116F11Rik	H3040E04	3,03	1,23
Lamr1	H3115D04	3,45	1,18	AV21687	H3064D08	3,24	0,64	136C6Rik	H3138A04	3,03	0,86
Rcl1	H4015E08	3,45	1,51	Hspc171	H4007E03	3,23	1,26	Timp1	H4066A01	3,03	1,57
Psmc1	H3134B06	3,45	1,08	Vti1b	H3146D09	3,23	1,07	Tra1	H3026G05	3,03	0,82
Aprt	H3040A04	3,45	1,13	Fbl	H3121H03	3,23	0,94	Gstm1	H3134F05	3,03	1,84
Lrpap1	H3153C07	3,45	1,19	2964A13Rik	H3037E10	3,22	1,31	Snrpb2	H3060B01	3,03	1,24
Zfp33	H4030C09	3,45	0,80		H3094C08	3,21	0,90	Shmt2	H3022C05	3,03	1,00
Rpl7a	H3144G03	3,45	1,14	Mod1	H3022F06	3,21	1,07	Cct3	H4046G09	3,03	0,58
	H3133H07	3,45	1,42	Snrpa1	H3004F02	3,21	1,13	Daf1	H3133G07	3,03	1,21
Recc1	H3156F02	3,44	0,72	Lgmn	H3063A08	3,21	0,67	11117C15Rik	H3018F12	3,03	0,89
Eif2s3y	H3079H10	3,44	0,86		H3112B12	3,21	1,51	Csrp2	H3128E07	3,03	1,25
	H3122B04	3,44	1,42	Cops7a	H3035H11	3,21	0,97	Snx2	H3127A10	3,02	0,64
583446M3Rik	H3027C11	3,43	0,73	Bin3	H4068H08	3,20	0,87		H3112B11	3,02	1,57
Depdc6	H3066B12	3,43	0,59	291O4Rik	H3008G08	3,20	0,68	Gadd45g	H3054C02	3,02	1,15
24119A14Rik	H3144C12	3,43	0,70	Cdc91l1	H3152C02	3,19	0,97		H3121C11	3,02	0,96
Uqcrc2	H3142A07	3,43	0,72		H3019C03	3,19	1,13	122A8Rik	H3113C11	3,01	1,26
Rpo1-3	H3121B06	3,43	1,22	Atp5c1	H3131A05	3,19	1,38	493553M18Rik	H3041B02	3,01	1,12
Aqp1	H4029C09	3,43	1,17	Ahsa1	H3020A07	3,19	0,96	Ndfip1	H3132E04	3,00	0,66
Pla2g4a	H4047H09	3,42	0,66	Gpt2	H3095C02	3,19	0,98	Taf9	H3026H12	3,00	1,08
Ndufs7	H3098A08	3,42	1,43	L3mbtl3	H4076C04	3,18	1,33	Eno3	H4027G12	3,00	0,63
	H3050G08	3,42	0,82	Cacybp	H3147H06	3,18	0,81				
Pam	H3024F12	3,42	0,96	1511H22Rik	H3041E08	3,18	1,12				
Rcn3	H3157C12	3,42	1,22	Eif3s2	H3011F05	3,18	1,10				
	H3100B10	3,42	0,91	265C2Rik	H3020A05	3,18	0,83				
D13Wsu5e	H3054H06	3,41	1,17	Kdelc1	H3060E09	3,17	0,75				
Mad2l1bp	H3125H04	3,40	1,23	Ociad1	H3132D07	3,17	0,89				
Nr3c1	H3147F05	3,40	1,10	Hspa9a	H3122D07	3,17	0,86				
	H3145G02	3,40	1,16	Pak1ip1	H3020G01	3,17	0,71				
Ubap2l	H3136C09	3,39	0,88	Fip1l1	H3124G04	3,17	1,51				
2794K13Rik	H3127B04	3,39	1,56	Pdcd6	H3021A02	3,17	1,19				
1721F5Rik	H3146H12	3,38	1,01	543437P3Rik	H4047E08	3,16	1,13				
Eif5a	H3124A10	3,38	0,81		H3011B09	3,16	1,07				
	H3126B05	3,38	1,88	Tmem33	H3105A02	3,16	1,30				
Rpl1a	H3150A03	3,37	1,07	Srp9	H3022B03	3,16	1,21				
Tulp4	H3132F10	3,37	0,94	Rcn2	H3006A07	3,16	0,61				
	H3113H01	3,37	1,06	Pex13	H4058C06	3,15	0,53				
4933417K4Rik	H3078G01	3,37	0,99	Zfp16	H3140D06	3,15	0,74				
	H3113H02	3,37	1,06	281484M1Rik	H3054B07	3,15	1,06				
Ccs	H3114G12	3,37	1,12	1112N22Rik	H4035C07	3,15	1,08				
Rga	H3121C06	3,37	1,02	276E2Rik	H3028E12	3,15	1,46				
Nudc	H3122D09	3,36	0,99	Nola2	H3027C01	3,15	1,14				
Bicc1	H3128H06	3,36	1,37	Capzb	H3148E03	3,14	1,04				
Fez1	H3159B03	3,36	1,15	Hba-a1	H3125H11	3,14	1,66				
Fem1b	H3029F04	3,36	1,35	Bzw2	H3018E10	3,14	0,47				
	H3117D09	3,36	1,40	Cd3z	H3129G03	3,14	1,33				
Atp5b	H4057D07	3,36	0,57	Al31568	H3098H07	3,14	1,35				
11164N1Rik	H3013E02	3,36	1,09	Trim37	H3028F12	3,14	1,24				
	H3045E05	3,35	0,92	Eif2s2	H3039F04	3,13	0,86				

Tabelle D.5: Expression aktivierter c-MYC–Zielgene nach *med24-knockdown* in Mausfibroblasten (NIH3T3 MycER K1), Teil III. Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen in shscr (scr)- und shmed24 (med24)-infizierten Zellen angegeben.

Ergebnislisten von cDNA-Microarray–Expressionsanalysen

Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24
	H3065E08	0,02	0,97		H3044A12	0,12	0,96		H3083B11	0,17	0,97
	H3104E04	0,03	0,94		H3127G12	0,12	0,94		H3050A02	0,17	0,99
	H3023B02	0,03	0,98		H3065E09	0,12	0,94	Bmp2k	H3024B10	0,17	0,81
	H3124F01	0,03	0,90		H3063C02	0,12	0,90	C80012	H3045G09	0,17	0,90
	H3063C12	0,03	0,99		H3071B02	0,12	0,98	Dap3	H3063A04	0,17	0,93
	H3101C06	0,03	0,89		H3092D04	0,12	0,94		H3056B12	0,17	0,84
	H3064E12	0,03	0,88		H3100F10	0,12	0,80		H3085H03	0,17	1,00
	H3046E07	0,03	0,92		H3063G03	0,12	0,97		H3139G06	0,17	0,97
	H3087C05	0,03	0,96		H3048E01	0,12	0,93		H3065H08	0,17	0,99
	H3065A01	0,03	0,90		H3089D11	0,12	0,98		H3063C07	0,17	0,86
	H3121G05	0,03	0,94	Tes3	H3139F09	0,12	0,90	Jarid1b	H3041C04	0,17	0,99
D12ErtD216e	H3041G11	0,03	0,98		H3051E04	0,12	0,86		H3019F10	0,17	0,81
A830008O07	H3065F02	0,04	0,86		H3041C12	0,12	0,92	Plekhh2	H4041A07	0,17	0,88
	H3121G04	0,04	0,93	Ptp4a2	H3126D09	0,13	0,90		H3033G06	0,17	0,91
	H3066E01	0,04	0,91		H3061G11	0,13	0,90	Pfas	H3008E10	0,17	0,97
	H3063H09	0,04	1,00		H3065F11	0,13	0,89		H3083A12	0,17	0,92
Actb	H3011G02	0,04	0,86	Helic1	H3082H03	0,13	0,95		H3100F02	0,17	0,95
	H3066F04	0,04	0,94		H3047B12	0,13	0,99		H3020D12	0,17	0,74
	H3047H09	0,04	0,91	Ung	H3090B05	0,13	0,98		H3056G06	0,17	0,85
	H4042H05	0,04	0,87		H4033D01	0,13	0,92	Fkbp1a	H3091A04	0,17	0,91
B230112I24Rik	H4079B11	0,04	0,99	Tceb2	H3002G06	0,13	0,98		H3071E04	0,17	0,94
	H3063B04	0,04	0,97	1700084E18Rik	H3081H01	0,13	0,99		H3045E07	0,17	0,96
	H3063B06	0,04	0,96	Nek1	H3035B07	0,13	0,94	BC024969	H3113C04	0,17	0,95
5730406M06Rik	H3087D02	0,04	0,74		H3071A04	0,13	0,94		H3065B10	0,17	0,96
Cdkal1	H3066D12	0,04	0,88	Waspip	H3100E12	0,14	0,82		H3010B02	0,17	0,97
	H3100A08	0,04	1,00	Trpm1	H3048B08	0,14	0,98	Stxbp3	H4077H05	0,17	0,93
	H3083C10	0,04	0,94	Hip2	H3020A08	0,14	0,87		H3082F08	0,17	0,93
	H3057H09	0,04	0,97	C030036D22Rik	H3062G02	0,14	0,92	061001015Rik	H3096A08	0,17	0,98
	H3056F05	0,04	0,81		H3046B03	0,14	0,83	Solt	H3108H03	0,17	0,96
Zfp248	H3064B07	0,04	0,91		H3077B12	0,14	0,97	Foxj2	H3064G02	0,17	0,86
Arhgap6	H3034D10	0,04	0,99	4933431M11Rik	H3064B04	0,14	0,82	2310066E14Rik	H3004F10	0,17	0,70
	H3087C10	0,05	0,87	Pik3r3	H3038E04	0,14	0,92		H3006A08	0,17	0,94
	H3047B02	0,05	0,91		H3063B07	0,14	0,91		H3044G10	0,17	0,82
	H3002A10	0,05	0,86		H3065E11	0,14	0,95		H3055G11	0,17	0,97
	H3032G03	0,05	0,99		H3083H04	0,14	0,95		H3093A03	0,17	0,97
Grik2	H4057B10	0,05	0,96	Pik3ap1	H4073E06	0,14	0,65	AU020772	H3046A10	0,17	0,97
2900080J11Rik	H3035F12	0,05	0,82		H3063F06	0,14	0,97		H3097G12	0,18	0,96
Grm7	H4008A02	0,05	1,00		H3020G07	0,14	0,99		H3051D10	0,18	0,96
	H3140E01	0,05	0,90		H4011C01	0,14	0,91		H3044G02	0,18	0,97
2010309L07Rik	H3032F09	0,06	0,94	5730421E18Rik	H3088B11	0,14	0,98		H3027F08	0,18	0,89
	H3099G01	0,06	0,94		H3055B02	0,15	0,96	Anln	H3101G12	0,18	0,96
1700011I03Rik	H4016H03	0,06	0,92		H3045A01	0,15	0,94	Atp8a1	H3065G09	0,18	0,92
NfkB1	H3156F06	0,06	0,87	Ilf3	H3090F12	0,15	0,83		H3035C12	0,18	0,99
	H3092B07	0,06	0,82		H3108C05	0,15	0,85	Cyp7b1	H3064E08	0,18	0,96
	H4017B12	0,06	0,82		H4038C07	0,15	0,95	D1ErtD646e	H3085A02	0,18	0,98
Helic1	H4078H08	0,06	0,81	C330008K14Rik	H3107H03	0,15	0,82	Hipk1	H3078A12	0,18	0,90
	H4041D04	0,06	0,91		H3038F01	0,15	0,83		H3071D06	0,18	0,97
	H3126B09	0,06	0,92		H3009A03	0,15	0,93		H3087H11	0,18	0,85
	H3064D06	0,06	0,86	1700034P14Rik	H4008D12	0,15	0,97	Csf3r	H3104A04	0,18	0,97
Tubb5	H3124H12	0,06	1,00	2610507L03Rik	H3047C05	0,15	0,90	Ppfia4	H3050A05	0,18	0,95
	H3037E08	0,06	0,94		H3104H09	0,15	0,99	Wdr45	H3074B10	0,18	0,97
B230343A10Rik	H3098B07	0,07	0,90	Gimap4	H3078E12	0,15	0,88	Slc24a5	H3089H12	0,18	0,90
	H3098G02	0,07	0,82	Abhd2	H3091E12	0,15	0,96		H4017G10	0,18	0,96
	H3140E02	0,07	0,88		H3083B06	0,15	0,96	1500011J06Rik	H4025H05	0,18	0,97
	H3040H01	0,07	0,81		H3008E06	0,15	0,89	Pdk3	H3152E06	0,18	1,00
4933402J24Rik	H4070F05	0,07	0,79		H3108C04	0,15	0,99		H3087A07	0,18	0,99
Smad9	H4017B03	0,07	0,96	Ptp4a2	H3004F07	0,16	0,94	4930544G21Rik	H3056H11	0,18	0,98
	H3129F07	0,07	0,88		H3054C11	0,16	0,92	Arf1	H3078H10	0,18	0,93
Mr1	H4007H12	0,07	0,83		H3006F02	0,16	0,97	Garnl3	H4038B02	0,18	0,93
	H3068H08	0,07	0,74	Grid2	H3127D11	0,16	0,88	Was	H3020F08	0,18	0,88
Cd44	H3066E02	0,07	0,89		H3034C08	0,16	0,94	Zw10	H3044E09	0,18	0,97
Actb	H3002D02	0,07	0,98		H3104A06	0,16	0,82		H4018A11	0,18	0,87
Gria4	H4033C12	0,07	0,90	A130052D22	H3038E01	0,16	0,89	Mrg1	H3059F03	0,18	0,94
	H3095C11	0,08	0,87		H3071E10	0,16	0,97	E430025E21Rik	H3006E10	0,18	0,88
	H4041D12	0,08	0,84	1810009B06Rik	H3087F12	0,16	0,87		H3042E10	0,18	0,68
AA415817	H3153D01	0,08	0,96	Taok1	H3095B02	0,16	0,79		H3095B06	0,18	0,89
Bai3	H4031A10	0,08	0,94		H3062A08	0,16	0,97	Pdgfd	H3148D03	0,18	0,98
	H4078C09	0,08	0,96	Gnb11	H3081A09	0,16	0,88	Apc	H3009E10	0,19	0,94
	H3057H10	0,09	0,92		H3064B05	0,16	0,98		H3049G03	0,19	0,96
AU014876	H3083G11	0,09	0,94		H3064C05	0,16	0,92		H3091C11	0,19	0,93
	H4018E10	0,09	0,88	2610036A22Rik	H3038H06	0,16	0,89	Dcn	H3148D05	0,19	0,99
	H3063G06	0,09	0,91	A530089I17Rik	H3137F06	0,16	0,92	5930412E23Rik	H3047A10	0,19	0,96
	H3065C01	0,09	0,97		H3096G06	0,16	0,96	Thnsl1	H3049D08	0,19	0,87
	H3051G09	0,09	0,97		H3020F05	0,16	0,83	Pzp	H3092E08	0,19	0,83
	H3033C03	0,09	0,94		H3064E01	0,16	0,85	Ednrb	H3065H05	0,19	0,94
	H3048C03	0,10	0,93	C230081A13Rik	H3146H09	0,16	0,88	Pacs1	H3136A10	0,19	0,94
	H3094E06	0,10	0,95	Pgm2	H3064B11	0,16	0,89	Prkcn	H4074C06	0,19	0,98
	H3012G09	0,10	0,95	Pawr	H3088F04	0,16	0,90	Wdly1	H3109F12	0,19	0,99
Nr3c1	H4077G05	0,10	0,97	Rb1	H3081A11	0,16	0,83	Foxn2	H3068A05	0,19	0,88
Col3a1	H3133G03	0,10	0,84		H3064E04	0,17	0,90		H3091H03	0,19	0,94
	H3091B05	0,10	0,98		H3069G12	0,17	0,91		H3046B01	0,19	0,89
	H3041E03	0,11	0,89	Rce1	H3007F06	0,17	0,91	C630013N10Rik	H3065C05	0,19	0,82
	H3093C05	0,11	0,89		H3065G08	0,17	0,95		H3083B07	0,19	0,96
	H4015H10	0,11	0,90	BC026657	H3093E11	0,17	0,97		H4016C09	0,19	0,91
	H3089D03	0,11	0,79	Maz	H3087F11	0,17	0,87		H3071B11	0,19	0,96
Cenpc1	H4008E11	0,12	0,96		H3092H04	0,17	0,91	AA959742	H3041A03	0,19	0,97
Crim1	H4073H04	0,12	0,96	Ankrd25	H3091F09	0,17	0,95		H4074A01	0,19	0,93
	H3087F07	0,12	0,94		H3088H08	0,17	0,99	Zfp644	H4073A02	0,19	0,95

Tabelle D.6: Expression reprimierter c-MYC–Zielgene nach *med24-knockdown* in Mausfibroblasten (NIH3T3 MycER K1), Teil I. Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen in shscr (scr)- und shmed24 (med24)-infizierten Zellen angegeben.

Ergebnislisten von cDNA-Microarray–Expressionsanalysen

Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24
Inpp5a	H3152F03	0,19	0,99	Fancd2	H3005A11	0,21	0,94	Mapkap1	H4016A05	0,22	0,94
Tbl1x	H3066G08	0,19	0,97	D930036F22Rik	H3094F04	0,21	0,90		H3033D03	0,22	0,95
	H3109C06	0,19	0,96		H3068G01	0,21	0,94	Brd3	H3027B07	0,22	0,91
Gtf3c2	H3037H04	0,19	0,93	Ppt1	H4076G09	0,21	0,92	Ndrp4	H3078D03	0,22	0,99
	H3046E03	0,19	0,98		H3066E09	0,21	0,84	Gkap1	H3139A03	0,22	0,98
Lgals9	H3102F05	0,19	0,99	Apbb2	H3007H08	0,21	0,94		H3088H06	0,22	0,99
	H3040H02	0,19	1,00	Asb8	H3046C02	0,21	0,86		H3045C04	0,23	0,95
Uble1a	H4037H08	0,19	0,98	BC013481	H3086G11	0,21	0,88	Zfp75	H4035H05	0,23	0,99
Rrm2	H3044E02	0,19	0,90	4930402H24Rik	H3081C11	0,21	0,96		H3044C03	0,23	0,85
	H3031C04	0,19	0,99	Itga5	H3020D09	0,21	0,89	Acbd3	H3125E03	0,23	0,95
	H3044A11	0,19	0,97	D11Ertid497e	H3001F08	0,21	0,87	Pex19	H3089C01	0,23	0,98
	H3012H11	0,19	0,93		H3123A06	0,21	0,95		H3051B06	0,23	0,97
	H4035B10	0,19	0,96		H3011C05	0,21	0,96	Pfkm	H3015E05	0,23	0,98
	H4031G02	0,19	0,97		H3144A07	0,21	1,00		H3088G01	0,23	0,92
Nsd1	H3050B01	0,19	0,95	Capza1	H3099A02	0,21	0,89		H3045F09	0,23	0,87
Ttc19	H3026E09	0,19	0,90	4933401N24Rik	H3108B11	0,21	0,96		H3044C07	0,23	0,98
	H3048H04	0,19	0,90	Wbscr16	H4032H05	0,21	0,98		H3087A10	0,23	0,95
	H3074F05	0,19	0,89		H3055A08	0,21	0,88		H3097H02	0,23	0,91
4831403C07Rik	H3052A12	0,19	0,90	Garnl1	H3151H10	0,21	0,99	Ncor1	H3037F09	0,23	0,91
	H3045G11	0,19	0,88		H3045D04	0,21	0,98	Ap3b1	H4001G09	0,23	0,84
Rab15	H3047C11	0,19	0,93	Pte1	H4041H07	0,21	0,98	Pip3ap	H3137F07	0,23	0,98
	H3066B02	0,19	0,87	Dock1	H3090E11	0,21	0,97	Rutbc1	H4038C12	0,23	0,88
	H3008D07	0,19	0,90		H3051B03	0,21	0,79	Rock2	H4060A02	0,23	0,88
AA960558	H4073H07	0,20	0,94	Depdc5	H3056H04	0,21	0,96	Appbp1	H3099C05	0,23	0,82
A730024F05Rik	H3104B02	0,20	0,89	Abcc5	H3040E10	0,21	0,98	Stag1	H3096H05	0,23	0,98
Map1lc3b	H3089A01	0,20	0,96		H3105C06	0,21	0,92	Bcl11b	H4079A09	0,23	0,92
2210404D11Rik	H3109G12	0,20	0,97	5730526G10Rik	H4052B09	0,21	0,92	Stx1b1	H3084E03	0,23	0,96
	H3026B06	0,20	0,87	Tm4sf8	H3104C01	0,21	0,98	1110003E01Rik	H3090H05	0,23	0,93
App	H3002F10	0,20	0,90	Nmt2	H3106A03	0,21	1,00		H3041D05	0,23	0,99
	H3044E03	0,20	0,97	Mme	H3148B06	0,21	0,82	Traf4	H3020G11	0,23	0,93
	H3032G07	0,20	0,91	1810049O03Rik	H3057G04	0,21	0,89	Zfp148	H4013A05	0,23	0,96
BC057893	H4027A11	0,20	0,96	Ap3m1	H4073G06	0,21	0,93	Ttrap	H3081D03	0,23	0,86
Lrp6	H3091C01	0,20	0,99	Lyp1a1	H4076F06	0,22	0,88		H3095H11	0,23	0,99
	H3031A09	0,20	0,86		H3020H02	0,22	1,00		H3006G12	0,23	0,92
	H3088F01	0,20	0,95	2310005N01Rik	H3098E08	0,22	0,89		H4060A08	0,23	0,97
5730530J16Rik	H3083G06	0,20	0,99		H4077F09	0,22	0,79		H3033C11	0,23	0,84
	H4016D04	0,20	0,84		H4041D11	0,22	0,98	Dag1	H3012F09	0,23	0,89
	H3139H11	0,20	0,79	D17Ertid288e	H3016E09	0,22	0,93	4930579A11Rik	H3081G06	0,23	0,87
Ptpn3	H4042D10	0,20	0,94	Ccl2	H4070H02	0,22	1,00		H3044D08	0,23	0,90
	H3037F07	0,20	0,96	Acac	H3029E12	0,22	0,97		H3082H05	0,23	0,80
	H3037C10	0,20	0,89		H3060D08	0,22	0,93	BC043118	H3064A12	0,23	0,94
	H3066A11	0,20	0,98	BC025920	H4026G04	0,22	0,85	Atf2	H4079A02	0,23	0,94
1110021L09Rik	H3100G05	0,20	0,89		H3046A08	0,22	0,99		H3039B12	0,23	0,93
	H3093C02	0,20	0,82		H3100B02	0,22	0,91	Mklin1	H3096D11	0,23	1,00
Hbxap	H3142C02	0,20	0,99	Wdr7	H3039H03	0,22	0,91	Ankrd28	H3047E11	0,23	0,98
Dhx40	H3159F10	0,20	0,92		H3088G09	0,22	0,96	Hdc	H3137D11	0,23	0,93
E130307A14Rik	H3084G02	0,20	0,96		H3015D12	0,22	0,96	Rps6	H4078H12	0,23	0,92
Gprc5c	H3018F10	0,20	0,85	5830411O09Rik	H4028G02	0,22	0,91	Ppp4c	H3018A07	0,23	0,95
	H3052H09	0,20	0,98	Alcam	H3099A07	0,22	0,93	Ncor1	H4076B02	0,23	0,99
Nrp1	H3051C10	0,20	0,97	Fem1a	H3021H11	0,22	0,96		H3077E06	0,23	0,92
	H3063G04	0,20	0,96	2410081M15Rik	H3093C04	0,22	0,75	Ptprg	H3032H01	0,23	0,91
Es1	H3044C01	0,20	0,95		H3065D06	0,22	0,68	2410030K01Rik	H3025F09	0,23	0,97
Mapkap1	H3056G02	0,20	0,93		H4073H02	0,22	0,96		H3034A08	0,23	0,92
Zfp532	H3052A08	0,20	0,99	Actb	H3018D09	0,22	0,91		H3046H01	0,23	0,95
Hs2st1	H4053B04	0,20	0,87		H3048A02	0,22	0,90	Agpat3	H3051H04	0,23	0,96
	H4008E03	0,20	0,92	Eltd1	H4074E03	0,22	0,92	1110039B18Rik	H4037F04	0,23	0,93
	H3124G02	0,20	0,89	9130011E15Rik	H3034H05	0,22	0,96		H3085D04	0,23	0,91
1810030O07Rik	H3022D07	0,20	0,80		H3082C03	0,22	0,99	C230078M14	H4033E05	0,23	0,98
5430437P03Rik	H3002H03	0,20	0,85	A730037L19Rik	H3128D04	0,22	0,89	Baiap1	H4025E09	0,23	0,82
	H3089G11	0,20	0,98	Rnf12	H3137H12	0,22	0,97	Nhlrc2	H3096B06	0,23	0,93
	H3085F08	0,20	0,96	D2Bwg1356e	H3132A01	0,22	0,87	Tigd3	H4054G05	0,23	0,96
Ogdh	H3083F12	0,20	0,99	Bre	H3078A10	0,22	0,96	Hrpt2	H4026H03	0,23	0,92
Ppp2r5c	H3035B04	0,20	0,94		H3065D09	0,22	0,81		H4074E02	0,23	0,95
Nvl	H3037A09	0,20	0,81	Alg8	H4060D02	0,22	0,79		H3050A08	0,23	0,92
	H3035H08	0,20	0,99	Dppa2	H3031D06	0,22	0,92		H3059D05	0,23	0,96
	H3047D11	0,20	0,97		H3010F12	0,22	0,97		H4077G07	0,23	0,94
	H3038G09	0,20	0,94	Vldlr	H3096H12	0,22	0,97		H3020H09	0,23	0,89
	H3035E10	0,20	0,96		H3056D08	0,22	0,94	D5Ertid585e	H3065H04	0,23	0,93
Phtf1	H3096A10	0,20	0,65		H4077E12	0,22	0,91		H3084F01	0,23	0,96
1810010G06Rik	H3085G12	0,21	0,84	2810047L02Rik	H3100G03	0,22	0,89	9630026M06Rik	H4075G09	0,23	0,95
Eif2b5	H3049E05	0,21	0,97	Pkp4	H3041H05	0,22	0,91	LOC433702	H4051C12	0,23	0,85
Prss35	H3057H02	0,21	0,93		H4025D07	0,22	0,84		H3034G10	0,23	0,98
Lamp1	H3003E05	0,21	0,91	Trps1	H3148H09	0,22	0,96		H3091A09	0,23	0,83
Pdha1	H3159D04	0,21	0,88		H3047E04	0,22	0,96	MGC65558	H3146G12	0,24	0,86
Ninj2	H3064E05	0,21	0,84		H3088H07	0,22	0,98		H3093C10	0,24	0,97
Chchd6	H3083F08	0,21	0,96		H3011G05	0,22	0,98	Lpin2	H3044C06	0,24	0,91
Nfat5	H3019B02	0,21	0,97	Plcb3	H3137G08	0,22	0,98		H3108C07	0,24	0,91
B4gal16	H3046G06	0,21	0,97		H3030H07	0,22	0,99		H3044H03	0,24	0,96
Foxo3	H3035A11	0,21	0,90	Apg4b	H4027C11	0,22	0,89		H3098F08	0,24	0,96
D11Ertid686e	H3078E05	0,21	0,92	1200013F24Rik	H3048D05	0,22	0,94	Nup160	H3107H06	0,24	0,94
	H3042B02	0,21	0,93	Jmjd2b	H3083F07	0,22	0,90		H3082C08	0,24	0,88
	H3037H09	0,21	0,94		H3096D05	0,22	0,94	St6gal2	H4034B06	0,24	0,98
	H3079A08	0,21	1,00	Rhobtb3	H3042B10	0,22	0,96	2700094F01Rik	H3033H02	0,24	0,89
D14Ertid231e	H3009E01	0,21	0,92	Rnpc2	H3108E06	0,22	0,89		H3044A01	0,24	0,98
Sp91	H4041A09	0,21	0,99		H3018H10	0,22	1,00	Rab13	H3050E03	0,24	0,94
Dbt	H3002E06	0,21	0,91	Ubr1	H3088C09	0,22	0,98	Ndufa7	H3142B02	0,24	0,94
	H3150B07	0,21	0,96		H4073F12	0,22	0,89	1110033J19Rik	H4063B12	0,24	0,90
	H3056H03	0,21	0,90	Cryz1	H3145F10	0,22	0,79	B230219D22Rik	H3006G09	0,24	0,92

Tabelle D.7: Expression reprimierter c-MYC–Zielgene nach *med24-knockdown* in Mausfibroblasten (NIH3T3 MycER K1), Teil II. Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen in shscr (scr)- und shmed24 (med24)-infizierten Zellen angegeben.

Ergebnislisten von cDNA-Microarray–Expressionsanalysen

Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24
	H3088B10	0,24	0,75		H4073E03	0,25	0,93		H3148C11	0,26	0,93
	H3092G07	0,24	0,92		H3005H04	0,25	0,93	Tmeff1	H4063E01	0,26	0,86
	H4060C09	0,24	0,95		H3045C08	0,25	0,92	Impact	H3113C03	0,26	0,88
	H4027A10	0,24	0,82		H4076H10	0,25	0,94		H3110G12	0,26	0,92
1110032E23Rik	H3095C09	0,24	0,96	Nr6a1	H4013G05	0,25	0,87	Pik4ca	H3040E12	0,26	0,77
2600003E23Rik	H4042F12	0,24	0,94	1010001N08Rik	H3150H07	0,25	0,74	Srrp	H3041B03	0,26	0,79
Grip1	H3065H02	0,24	1,00	Zfpm2	H3155A04	0,25	0,89		H4001E08	0,26	0,88
C030048H21Rik	H3091H04	0,24	0,97	Ppp2ca	H3038H07	0,25	0,91		H4079G01	0,26	0,98
	H3054C04	0,24	0,99	Vav2	H3037E11	0,25	1,00	C330021A05Rik	H4063F09	0,26	0,92
Dlgh2	H3066G02	0,24	0,71		H3060C09	0,25	0,97		H4046E04	0,26	0,94
Rtel1	H3148H01	0,24	0,96		H3095G11	0,25	0,96	Sh3d1B	H4056H07	0,26	0,48
	H3081D07	0,24	0,94	Rere	H3096D04	0,25	0,92	Xpo6	H3137C01	0,26	0,85
F10	H4051F01	0,24	0,95	B230208N19Rik	H4038C11	0,25	0,88	Zfp291	H4034G03	0,26	0,79
	H3040D09	0,24	0,94	Rab3c	H4035G01	0,25	0,85		H3074D10	0,26	0,66
AW495713	H3110G10	0,24	0,99	Tmem19	H4031F06	0,25	0,94	Mpo	H4020G08	0,26	0,71
	H3083H10	0,24	0,98		H3089D12	0,25	0,95	Cdh1	H3110H01	0,26	0,99
	H4028F11	0,24	0,86	Cab39	H3037F03	0,25	0,90	2810441C07Rik	H4066H09	0,26	0,90
Pftk1	H3136F11	0,24	0,89	Nr5a2	H4017E05	0,25	0,97	Kif1b	H4025F10	0,26	0,93
	H3046H06	0,24	0,97	Jmjd1c	H4076E05	0,25	0,94		H3096G11	0,26	0,94
Bach	H3083C06	0,24	0,87		H4058D04	0,25	0,92	Birc6	H3134H07	0,26	0,99
	H3051D01	0,24	0,95		H3078G09	0,25	0,82	A530052I06Rik	H4076A03	0,26	0,99
Hmgcr	H3032C10	0,24	0,95		H3089B04	0,25	0,92	Es1	H4016C12	0,26	0,72
	H3062B10	0,24	0,94		H3110C02	0,25	0,83	Son	H3094B06	0,26	0,82
Actb	H3018D10	0,24	0,88		H3090A07	0,25	0,92	1200003M09Rik	H4007E11	0,26	0,60
Sec24a	H3150H02	0,24	0,80		H3066D03	0,25	0,89	D9ErtD280e	H3045A07	0,26	0,87
C130089L09Rik	H4008G08	0,24	0,98	1190005F20Rik	H3081D05	0,25	0,90		H3124F05	0,26	0,70
	H3091D10	0,24	0,99		H3041H03	0,25	0,86	Ccnt2	H4052B10	0,26	0,89
	H3040D11	0,24	0,93	Slc20a2	H3008C06	0,25	0,93	Rbm5	H4046A05	0,26	0,54
2700008B19Rik	H4068B11	0,24	0,94	Xrn1	H3113G06	0,25	0,95	Tapbp	H3003B04	0,26	0,99
4631427C17Rik	H3095F06	0,24	0,93		H3072F05	0,25	0,96	Myo1c	H3018G06	0,26	0,87
	H3060E03	0,24	0,99	Dgkz	H4074E12	0,25	1,00	Ppm1e	H4027A07	0,26	0,73
	H3032F05	0,24	0,91	Glb1	H3137B10	0,25	0,98	Sox2	H4060H08	0,26	0,74
A130030D10Rik	H3039B07	0,24	0,92		H3048D06	0,25	0,82		H3110H04	0,26	0,58
	H3061A09	0,24	0,98	0610025L06Rik	H3065G01	0,25	0,95		H3104B04	0,27	0,83
	H4068H09	0,24	0,81	Mapk1	H4058A10	0,25	1,00		H4018G02	0,27	0,92
	H3054G01	0,24	0,90	Gas1	H3141F05	0,25	0,96	Kctd5	H3045C03	0,27	0,54
Tmem19	H3127A09	0,24	0,85		H4056G01	0,25	0,99	9130227L01Rik	H3088G12	0,27	0,77
5430414B12Rik	H3085C09	0,24	0,93		H4001G01	0,25	0,97		H4076C08	0,27	0,88
	H3077A10	0,24	0,83		H4035E08	0,25	0,81		H3100G11	0,27	0,94
Usp8	H4041D02	0,24	0,97	4432411E13Rik	H4073D05	0,26	0,92	Rbm15	H4079F04	0,27	0,59
	H3109H07	0,24	0,87	BC038167	H3108E08	0,26	0,91	Gm67	H3094G09	0,27	0,84
1700081L11Rik	H4078D02	0,24	0,98	Nmt3	H3134D03	0,26	0,88	Csf3r	H4060B03	0,27	0,75
	H3062H03	0,24	0,95	Itsn1	H4038H01	0,26	0,96	Tex2	H3011B11	0,27	0,70
	H4046D05	0,24	0,95	Hmgb2l1	H4058H05	0,26	0,91	Adora1	H4030G09	0,27	0,87
Ppp1r14c	H3056B09	0,24	0,99	Slc39a6	H4052G10	0,26	0,78	A630082K20Rik	H3089G07	0,27	0,77
	H4047G12	0,24	0,87	Sirt1	H4035A01	0,26	0,93	Fgfr2	H3030C10	0,27	0,55
Al462493	H3145G05	0,24	0,93	Qtrt1	H3091D09	0,26	0,82	Zdhhc17	H4054D01	0,27	0,83
Nfe2l2	H3090E02	0,24	0,96		H4074H12	0,26	0,95	Gcn1l1	H3018G10	0,27	0,83
Atp11c	H4073C09	0,24	0,88	Aurka	H4058F07	0,26	0,85	5730409G15Rik	H3014B07	0,27	0,77
	H3066B08	0,24	0,94		H3157H03	0,26	0,95	2610301B20Rik	H4076C03	0,27	0,83
	H3031G09	0,24	0,94	Ppib	H4074D10	0,26	0,89	Oaz2	H3093D10	0,27	0,60
4931406P16Rik	H3056H02	0,24	0,89	Rnh1	H3123F11	0,26	0,98	Brpf3	H4025A10	0,27	0,34
Psmc11	H4008A07	0,24	0,95	Atp2a3	H3110A11	0,26	0,70		H3041F10	0,27	0,90
	H3035A07	0,24	0,98	Hirip5	H3138D10	0,26	0,86	Paip2	H3085F03	0,27	0,80
Hspbp1	H4060E10	0,24	0,88		H4037F03	0,26	0,90	Sox7	H4027C01	0,27	0,82
	H3140E09	0,24	0,97	A230098N10Rik	H4078E05	0,26	0,97		H3089F11	0,27	0,90
4933405A16Rik	H3089G03	0,24	0,80	1810009B06Rik	H4046B07	0,26	0,99	Lsmp	H3038F05	0,27	0,94
	H3062G04	0,24	0,86	Aldh1a1	H3158H04	0,26	0,94	Cpeb1	H3140C09	0,27	0,96
1810073P09Rik	H3103H09	0,25	0,93	Gpatc2	H4008C09	0,26	0,91		H3117G01	0,27	0,41
	H4035H10	0,25	0,93	Pacs1	H4046A08	0,26	0,99	Col4a3bp	H4033E06	0,27	0,83
4932414N04Rik	H3064F11	0,25	0,93		H4041B02	0,26	1,00	Dach1	H4046D06	0,27	0,84
	H3079B02	0,25	0,99	Igf2r	H4029B01	0,26	0,84	6430706D22Rik	H4075F11	0,27	0,59
	H3103F07	0,25	0,79	Ifngr2	H3114F11	0,26	0,97	Ltbp3	H4042B11	0,27	0,94
	H3065H01	0,25	0,87		H4041G02	0,26	0,94	Parp6	H4028D06	0,27	0,99
	H4021F05	0,25	0,98		H3101H06	0,26	0,98	Centg3	H4041D05	0,27	0,84
	H3065A05	0,25	0,86	Arid4a	H3146B01	0,26	0,99	Tmem38a	H4028F06	0,27	0,84
5830411O09Rik	H4029H10	0,25	0,94		H4037B02	0,26	0,88	Tbc1d1	H3063A06	0,27	0,36
Al429613	H3050G11	0,25	0,89		H3060H01	0,26	0,98	BC066028	H4051E05	0,27	0,64
E130308A19Rik	H3139B09	0,25	0,90	Pkp4	H4038H07	0,26	0,96		H4068C05	0,27	0,90
Sbcbp4	H4015B07	0,25	0,85	1810064L21Rik	H3127F11	0,26	0,97	Ube2d2	H4037A07	0,27	0,48
	H3150D04	0,25	0,89		H4003G02	0,26	0,96	Kremen1	H3078C08	0,27	0,64
AA415817	H3090C10	0,25	0,90	Gzmm	H4026C01	0,26	0,89	4932702F08Rik	H3084A04	0,27	0,70
9430067K14Rik	H4017G04	0,25	0,92		H3153C08	0,26	0,97		H3105C11	0,27	0,74
AA408278	H3004D01	0,25	0,95		H4053C09	0,26	0,99	Gphn	H3107C12	0,27	0,57
Tbx20	H3040G02	0,25	0,83		H4057D09	0,26	0,94	5730599I05Rik	H4063G07	0,27	0,55
	H3095A08	0,25	0,86	Fbx117	H4017A07	0,26	0,89	2210020M01Rik	H4018C02	0,27	0,67
Actn2	H4073B05	0,25	1,00		H4073D08	0,26	0,72		H3065C10	0,27	0,83
	H3066F06	0,25	0,97	Gcl	H4075F02	0,26	0,99	Adk	H4075A12	0,27	0,58
Mns1	H3029H04	0,25	0,96		H3098H08	0,26	0,93	Rin2	H4067C07	0,27	0,83
Diap2	H3038C03	0,25	0,96	Man2a1	H3041H01	0,26	0,91	Myh6	H4028E07	0,27	0,65
	H3044H07	0,25	0,90	Taok1	H3016G10	0,26	0,95	Mb	H4007E05	0,27	0,46
	H4073C02	0,25	0,99		H4026H06	0,26	0,86	Suv420h1	H3077D06	0,27	0,99
Nup88	H4041F11	0,25	0,89	Rheb	H4073C07	0,26	0,94	Commdb	H4067E09	0,27	0,64
	H3088F05	0,25	0,92	Gq	H3049F07	0,26	0,63	Pex7	H4068E04	0,27	0,88
Mef2c	H4074E10	0,25	0,94	D130059P03Rik	H3022H05	0,26	0,36	Kif3b	H4068H06	0,27	0,72
Nup50	H3124F02	0,25	0,88		H4008B03	0,26	0,99	Slc27a2	H4041C06	0,27	0,79
Sfxn2	H3044H08	0,25	0,96	Cdh11	H3114B09	0,26	0,91	4732465J09Rik	H4042A01	0,27	0,90
Ptprc	H4075C04	0,25	0,95		H4018A10	0,26	0,84		H4042G09	0,27	0,90

Tabelle D.8: Expression reprimierter c-MYC–Zielgene nach *med24-knockdown* in Mausfibroblasten (NIH3T3 MycER K1), Teil III. Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen in shscr (scr)- und shmed24 (med24)-infizierten Zellen angegeben.

Ergebnislisten von cDNA-Microarray–Expressionsanalysen

Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24	Genname	Klon	scr	med24
Paip1	H3056A10	0,27	0,41	Cops5	H4025F12	0,29	0,77		H3098C08	0,31	0,91
Ufd1l	H4013C07	0,27	0,74	Cspg3	H4034A07	0,29	0,62	Ptp1b	H3130A07	0,31	0,88
	H4075A01	0,27	0,97		H3074H04	0,29	0,90	Polr3g	H4032E06	0,31	0,81
1110063F24Rik	H4035A05	0,27	0,95		H4016F11	0,29	1,00		H4051A10	0,31	0,94
Sema3e	H3063B01	0,27	0,49		H4032B06	0,29	0,41	Cpox	H3052C08	0,31	0,99
Ammecr1	H4027B09	0,27	0,89	Swap70	H3045C06	0,29	0,35		H3095A03	0,31	0,99
Arfrp2	H4060F08	0,27	0,98	Exosc7	H4046G05	0,29	0,79	Ptpn7	H4021F06	0,31	0,57
	H4046C10	0,27	0,96	4732465J09Rik	H4008H12	0,29	0,81		H4029D02	0,31	0,92
	H4008A10	0,27	0,88		H3083C12	0,29	0,89	Myh10	H4051D03	0,31	0,94
Dapk1	H4060C12	0,28	0,77	Mtap4	H3044F11	0,29	0,87	Tm6sf1	H4075E11	0,31	0,84
6330500D04Rik	H4074F04	0,28	0,57	AA881470	H3020D01	0,29	0,78	Dnttip1	H3133E12	0,31	0,64
Dnmt3b	H3048G07	0,28	0,47	4732486I23Rik	H4013G02	0,29	0,95	Dbi	H3124E12	0,31	0,85
	H3115B06	0,28	0,96	4930451A13Rik	H3136D09	0,29	0,80		H4052H07	0,31	0,77
Rbm16	H3116F10	0,28	0,67	Usp3	H4079D06	0,29	0,90	Igf1bp1	H4032G08	0,31	0,79
Tead1	H4053B09	0,28	0,97		H4076A09	0,29	0,68	Tagln	H3035E11	0,31	0,61
	H3044A10	0,28	0,80	Add3	H3095H08	0,29	0,97	Appbp2	H4028D01	0,31	0,91
	H3005F05	0,28	0,98	AL033314	H3127H09	0,29	0,90		H4047C12	0,31	1,00
3930401K13Rik	H3018E12	0,28	0,84	Trerf1	H3060G12	0,29	0,60	G630013P12Rik	H4060G10	0,31	0,71
	H3139A02	0,28	0,95	Wac	H4046G06	0,29	0,71	Slc25a11	H3008A02	0,31	0,85
	H3037B10	0,28	0,77	A630035I11Rik	H4041E10	0,29	0,86		H3089F04	0,31	0,80
Al194318	H4054D04	0,28	1,00	Sumo2	H3128A09	0,29	0,61	Cbl	H4076D01	0,31	0,74
	H3139G03	0,28	0,76		H4051E01	0,29	0,88		H3045E01	0,31	0,72
Cct3	H4053H10	0,28	0,83	Cpm	H4042B09	0,29	0,51	Sfrs10	H3044B05	0,31	0,72
B930006L02Rik	H4047G11	0,28	0,96	4930522L14Rik	H3115B11	0,29	0,54	Mrpl19	H4061E08	0,31	0,94
4931408L03Rik	H3153D06	0,28	0,56		H3039D01	0,29	0,66	Clasp2	H3064G03	0,31	0,81
	H4060E04	0,28	0,76	Trim59	H3098A03	0,29	0,77	Tnpo1	H3078G03	0,31	0,64
BC019575	H4033G02	0,28	0,87	Ern1	H4078E04	0,29	0,55	Apg7l	H3139C08	0,31	0,94
Msrb3	H4047A01	0,28	0,60	Sox6	H4074H04	0,29	0,82		H3065F06	0,31	0,90
Polh	H4069E03	0,28	0,88	Whsc111	H4033H09	0,29	0,98	1810034M08Rik	H3002G02	0,31	0,67
Palcs	H4024F10	0,28	0,92		H4077A12	0,29	0,98	Fyb	H4079C12	0,31	0,97
Ireb2	H4047H07	0,28	0,61		H4024D05	0,29	0,97	Slc8a1	H4073H06	0,31	0,87
Ptc2a	H4052G07	0,28	0,84	Siat7b	H4073G12	0,29	0,87		H3150F05	0,31	0,68
	H3085H12	0,28	0,99	Zhyve26	H4058E11	0,29	0,98		H3150B03	0,31	0,97
	H4017G08	0,28	0,43		H4054G01	0,29	0,78	Flnb	H4052C03	0,31	0,96
2610002F03Rik	H3121H01	0,28	0,60	Actg1	H3046A05	0,29	0,57	2610024G14Rik	H3045F07	0,31	0,98
Meif2c	H4075D09	0,28	0,88	Chrnbl	H4029F05	0,29	0,89		H3087B08	0,31	0,81
Sdccag33l	H4011G12	0,28	0,68		H4057D11	0,29	0,65		H4041F01	0,31	0,83
Rad1	H3010E04	0,28	0,87	Med6	H3026H07	0,29	0,66	Kctd15	H3049B04	0,31	0,75
	H4008A01	0,28	0,90	Tgolin1	H4016D12	0,29	0,91	Nbeal1	H4025G01	0,31	0,89
Asxl2	H3118B11	0,28	0,90	Depdc6	H3048C08	0,29	0,93	Dnmt3a	H4047B03	0,31	0,86
4632428N05Rik	H4011A04	0,28	0,49		H3091A07	0,29	0,87	Tbrg3	H4079F12	0,31	0,71
	H3029G07	0,28	0,70	Ncoa2	H4008G01	0,29	0,84		H4046F10	0,31	0,61
BC055915	H3109E12	0,28	0,72	Suhw4	H3121E05	0,30	0,57	Pbx3	H4075A03	0,31	0,53
Elov16	H4060E12	0,28	0,56	Il6st	H4026E05	0,30	0,89	Braf	H3015E02	0,31	0,74
2510006D16Rik	H3020E08	0,28	0,85		H4033E11	0,30	0,71	D130059P03Rik	H4018B02	0,31	0,47
	H3064H01	0,28	0,56	Zip639	H4030C08	0,30	0,61	Hyal1	H4011E09	0,31	0,86
9130012D09Rik	H3046B10	0,28	0,54		H4034F08	0,30	0,61		H3098D08	0,31	0,79
	H4011H12	0,28	0,93	Pum2	H4075F08	0,30	0,80		H3009G11	0,31	0,71
	H3145E09	0,28	0,96	Epn2	H3051F05	0,30	0,43	Sdc4	H3138F12	0,31	0,76
Rbm6	H3045F01	0,28	0,92		H4041D01	0,30	0,72	Pggt1b	H4076G03	0,31	0,70
	H4068A02	0,28	0,81	BC057627	H3098C01	0,30	0,92	Zfx	H4075B02	0,31	1,00
A230056P14Rik	H4069A07	0,28	0,66	MGC65558	H3067G12	0,30	0,70		H4063A05	0,31	0,91
Djc9	H3078E03	0,28	0,73		H4078F12	0,30	0,56	Nup160	H3020G03	0,31	0,91
	H4077B02	0,28	0,65	D630048P19Rik	H4035A07	0,30	0,63		H3027B08	0,31	0,66
Myst4	H3148G01	0,28	0,69	Ubap2	H3050B05	0,30	0,87	Uchl1	H3059F01	0,32	0,92
	H3074G03	0,28	0,59		H3096B03	0,30	0,96		H4024H09	0,32	0,77
	H4024D11	0,28	0,62	Arid4a	H3093F05	0,30	0,76	D930036F22Rik	H3134B12	0,32	0,91
Shb	H4024H08	0,28	0,80	Slc37a1	H4074E11	0,30	0,91	b1	H3134B08	0,32	0,72
	H4030E05	0,28	0,83		H3046B05	0,30	0,78	Xpo7	H4060F10	0,32	0,78
	H4076B09	0,28	0,58		H3039G07	0,30	0,84	2010300G19Rik	H4076A10	0,32	0,82
Sdccag33	H4025E07	0,28	0,49		H4028H02	0,30	0,78	Rhpn2	H3090C03	0,32	0,93
Tfpi	H4057H12	0,28	0,83		H4016G12	0,30	0,75	BC054822	H4013E07	0,32	0,73
Prkch	H4073F10	0,28	0,79		H3065C11	0,30	0,85	Yes	H3144H09	0,32	0,85
	H3102C02	0,28	0,93		H3110G05	0,30	0,56	Djc7	H3044E12	0,32	0,57
Calr	H3021G11	0,28	0,70		H3033A08	0,30	1,00	Tebp	H3113F10	0,32	0,93
2810474O19Rik	H4061F02	0,28	0,60	2610312F20Rik	H3142H02	0,30	0,82		H4027F12	0,32	0,72
Cac1c	H4024C09	0,28	0,31		H3142D03	0,30	0,63		H3044D07	0,32	0,84
	H4074E08	0,28	0,77	Odz2	H4033F03	0,30	0,87	Creb3l2	H3140D02	0,32	0,86
	H3051A06	0,29	0,75	Ercc4	H4077F11	0,30	0,93	Trim14	H3110B02	0,32	0,82
	H3119A01	0,29	0,99		H4074A07	0,30	0,96	Rqcd1	H3040B11	0,32	1,00
	H3059E01	0,29	0,92		H3039C01	0,30	0,76		H3141F07	0,32	0,58
Prkce	H4074F06	0,29	0,98	Rapgef1	H3098C02	0,30	0,63	Senp2	H4046F03	0,32	0,89
Epb4.1	H4076D10	0,29	0,78		H3138H01	0,30	0,74	AA536808	H3139G02	0,32	0,64
C80913	H3147B12	0,29	0,67		H3135C07	0,30	0,86	Chtf18	H4070F07	0,32	0,96
	H4029F06	0,29	0,97	Zip482	H3022H10	0,30	0,93	Vamp3	H3025H09	0,32	0,66
Fancc	H4008H03	0,29	0,63	Marcks	H3113D09	0,30	0,65	5830483C08Rik	H4076G05	0,32	0,63
Abcd3	H3098A10	0,29	0,89	Fbxw8	H4052E07	0,30	0,83	Fbxl3	H4075C07	0,32	1,07
Kif3c	H4015A11	0,29	0,94	E430025E21Rik	H3087H08	0,30	1,00	Clmn	H4041C03	0,32	1,15
	H3034B06	0,29	0,93	9130404D08Rik	H3038D06	0,30	0,80		H4066H08	0,32	1,01
	H3065E02	0,29	0,99		H3133F09	0,30	0,72	Exoc8	H3134C06	0,32	1,14
4432411E13Rik	H3039B08	0,29	0,48	Fras1	H4008G10	0,30	0,86	Wdfy3	H3016C06	0,32	1,08
	H4073H05	0,29	0,66	2210409D07Rik	H4041H06	0,30	0,73	Pex3	H3129G06	0,32	1,07
	H3095G03	0,29	0,78		H3063E08	0,30	0,59	Rapgef2	H3033C12	0,32	1,01
	H4001F10	0,29	0,82		H4015B12	0,30	0,70	Acx3	H4015H06	0,32	1,21
Zbtb20	H3002D05	0,29	0,81	Wdr45l	H3033D11	0,31	0,72	Lphn3	H4008F05	0,32	1,24
	H3135A01	0,29	0,72	2310037I24Rik	H4021C04	0,31	0,66	4933434E20Rik	H3132F07	0,32	1,33
4732418C07Rik	H4073A04	0,29	0,96		H3020A09	0,31	0,82	1700025K23Rik	H4025E05	0,32	1,41
Syt7	H3123A07	0,29	0,95		H4030E02	0,31	0,96	Psmb2	H4047F06	0,32	1,29

Tabelle D.9: Expression reprimierter c-MYC–Zielgene nach *med24-knockdown* in Mausfibroblasten (NIH3T3 MycER K1), Teil IV. Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen in shscr (scr)- und shmed24 (med24)-infizierten Zellen angegeben.

Genname	Klon	scr	med24
Nup88	H4017H11	0,32	1,03
Arhgef7	H3077B03	0,32	1,23
6330442E02Rik	H4041C02	0,32	1,25
Tpm3	H3022F08	0,32	1,23
	H3122A01	0,32	1,21
Tnrc15	H4074G12	0,32	1,41
3632431M01Rik	H4078H09	0,32	1,04
Slc30a5	H4063F06	0,32	1,02
	H3046C05	0,32	1,08
Kif5b	H3001E01	0,32	1,38
Flnb	H3008B12	0,32	1,25
	H4054B01	0,32	1,06
Golga1	H3148B02	0,32	1,15
C130089L09Rik	H4034G05	0,32	1,06
Tmem23	H4073E01	0,33	1,12
Panx1	H4015A09	0,33	1,14
	H3074E09	0,33	1,03
Nek7	H3074A03	0,33	1,04
Mef2a	H4016G09	0,33	1,17
	H3033D10	0,33	1,13
	H3051E08	0,33	1,46
	H4030E10	0,33	1,04
Erb2ip	H4075C12	0,33	1,49
	H3062F03	0,33	1,07
	H3121A03	0,33	1,30
Ash2l	H3028A10	0,33	1,32
Ptpns1	H3147F03	0,33	1,64
	H3089E10	0,33	1,28
Ercc6	H4058D03	0,33	1,09
Senp6	H4018D02	0,33	1,38
	H3005E08	0,33	1,10
Cs	H4053H08	0,33	1,03
Riok2	H4077C12	0,33	1,07
Zcchc10	H4046A07	0,33	1,70
Cpne7	H4030H10	0,33	1,01
	H3097A12	0,33	1,07
Rpa1	H4047E02	0,33	1,16
Lmnb1	H4025D12	0,33	1,11
2600014M03Rik	H4029C03	0,33	1,20
Sptlc2	H4046C12	0,33	1,04
	H3133A04	0,33	1,10
Fanca	H4056H04	0,33	1,07
Cbr2	H3096E03	0,33	1,06
	H3065E12	0,33	1,17
Macf1	H3138C11	0,33	1,04
	H3133H09	0,33	1,05
	H3088H12	0,33	1,00
Mor14l1	H4007G12	0,33	1,04
Igf2r	H4028H10	0,33	1,13
	H3098A02	0,33	1,01
Myo9b	H4064H02	0,33	1,06

Tabelle D.10: Expression reprimierter c-MYC–Zielgene nach *med24-knockdown* in Mausfibroblasten (NIH3T3 MycER K1), Teil V. Die relative Expression in 4-OHT-behandelten Zellen ist relativ zu der in mit Ethanol behandelten Zellen in shscr (scr)- und shmed24 (med24)-infizierten Zellen angegeben.

E Plasmidkarten

E.1 pCDNA3

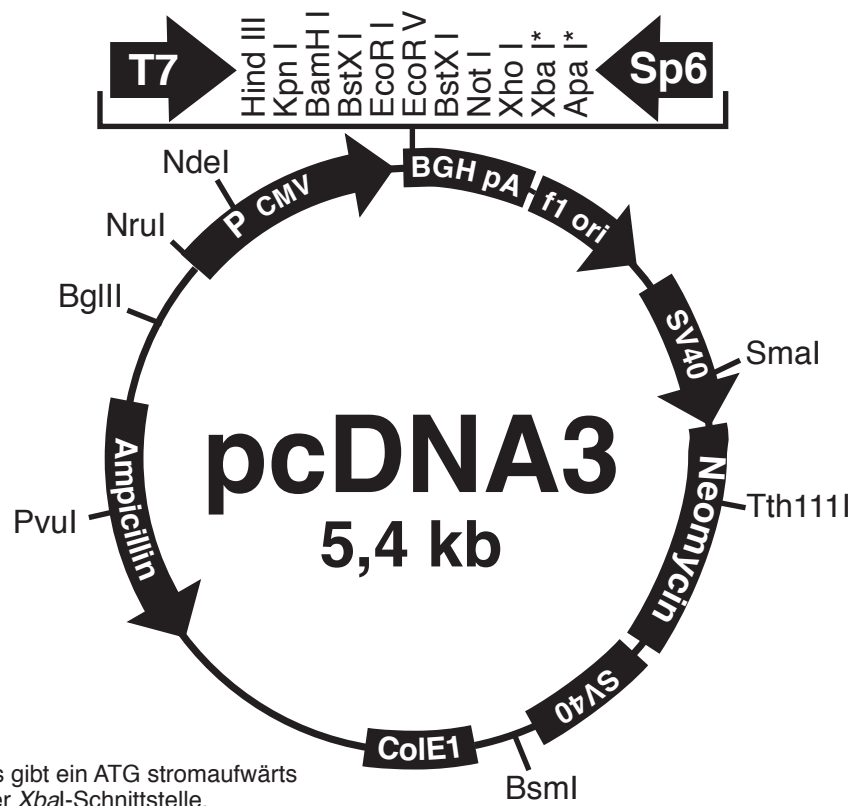


Abbildung E.1: Plasmidkarte von pCDNA3. Verändert nach Herstellerangaben.

E.2 pSUPER.retro

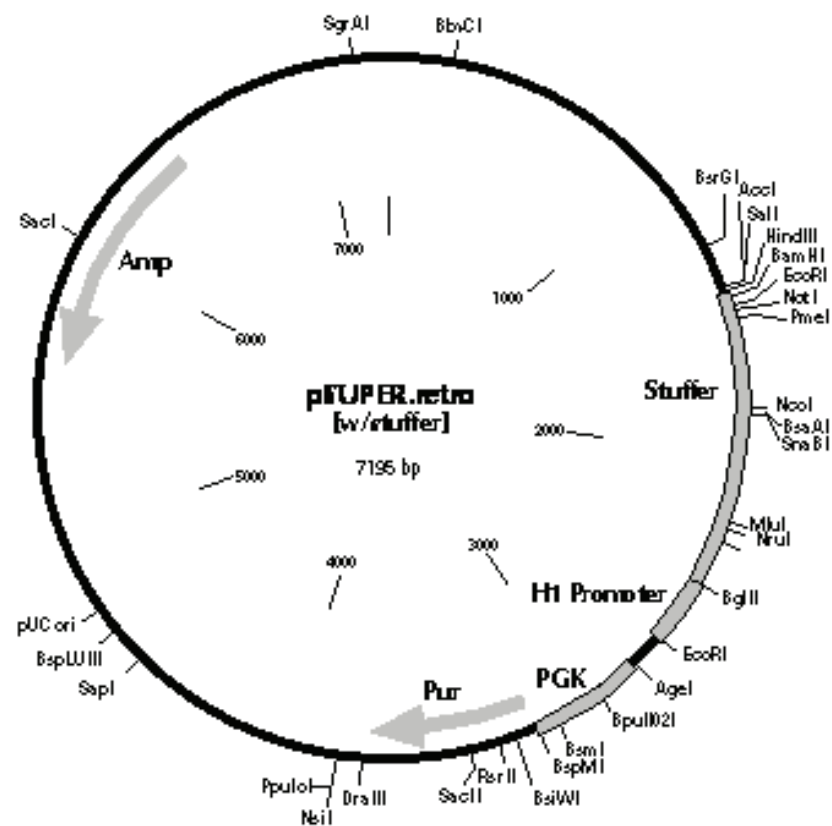


Abbildung E.2: Plasmidkarte von pSUPER.retro.puro. Nach Herstellerangaben.

F Veröffentlichungen

Im Rahmen der Anfertigung dieser Arbeit wurden wesentliche Teile daraus veröffentlicht:

- Till Adhikary, Caroline Bouchard und Martin Eilers
c-Myc induces localized H2A.Z exchange in the promoters of target genes
Posterpräsentation, Abcam Chromatin Structure & Function,
15.–18. November 2005, Nassau, Bahamas
- Till Adhikary, Caroline Bouchard und Martin Eilers
c-Myc induces localized H2A.Z exchange in the promoters of target genes
Posterpräsentation, EMBL Transcription Meeting,
26.–30. August 2006, Heidelberg
- Till Adhikary, Caroline Bouchard und Martin Eilers
c-Myc induces localized H2A.Z exchange in the promoters of target genes
Posterpräsentation, Chromatin-mediated biological decisions,
5.–7. Oktober 2006, Marburg
- Sandra Bernard*, Till Adhikary*, Dorothea Maaß, Joan W. Conaway und Martin Eilers
MED24/TRAP100 binds to c-MYC and is required for gene activation
in Vorbereitung ("*" bedeutet gleichwertiger Beitrag)

G Danksagungen

Ich danke Prof. Martin Eilers für die Bereitstellung interessanter Themen und viele gute Ideen. Prof. Michael Bölker danke ich für die Anfertigung des Erstgutachtens. Prof. Renate Renkawitz-Pohl und Prof. Klaus Lingelbach danke ich für die weiteren Gutachten. Besonders danken möchte ich Sovana Adhikary, Caroline Bouchard, Andreas Hock, Viola Paulus-Hock und Martina Seitz für Freundschaft und Hilfe in allen Lebenslagen. Sandra Bernard, Bernd Berwanger, Doris Dobrin, Anne Dwertmann, Sven Gallinat, Antje Grzeschiczek, Barbara Herkert, Steffi Herold, Bianca Jebavy, Theresia Kreß, Martha Kresse, Walter Lauer, Dorothea Maaß, Mona Meyer, Jean-François Naud, Michael Neuhaus, Nikita Popov, Jens-Peter Reese, Birgit Samans, Christina Schüle, Sven Starke, Michael Wanzel und Axel Weber danke ich für ein freundliches und hilfsbereites Arbeitsklima. Wolfgang Meißner danke ich für theoretische und praktische Unterstützung bei der Chromatographie, Robert Slany danke ich für hilfreiche Tipps. Thomas Ruppert danke ich für massenspektrometrische Analysen. Birgit Samans, Michael Krause, Angelika Filmer und Sigrid Bischofsberger danke ich für Microarray-Analysen und freundliche Hilfe bei der Auswertung. Tobias Otto danke ich für Hilfe bei FACS-Messungen. Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die Unterstützung meines Studiums und insbesondere meinem Vater für unermüdliche Korrekturarbeit.

H Lebenslauf

I Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich meine Dissertation

Identifikation neuer Bindungspartner
des c-MYC/MIZ-1–Netzwerks und
Charakterisierung der Regulation der Transkription
durch die c-MYC–Kofaktoren H2A.Z und MED24

unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Martin Eilers (Fachbereich Medizin, Philipps-Universität Marburg) selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Till Adhikary

Marburg, den 1. September 2008